



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição – PPGAN

ESTUDO DA MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO
STUDY OF RIPENING OF ARTISAN MINAS CHEESE OF SERRO

JULIANA DE OLIVEIRA CARNEIRO

RIO DE JANEIRO
2020

JULIANA DE OLIVEIRA CARNEIRO

ESTUDO DA MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO
STUDY OF RIPENING OF ARTISAN MINAS CHEESE OF SERRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição.

Orientadora: Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz

Coorientadora: Dra. Ana Carolina Sampaio Doria Chaves

RIO DE JANEIRO
2020

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

C289 Carneiro, Juliana de Oliveira
Estudo da Maturação do Queijo Minas artesanal do
Serro / Juliana de Oliveira Carneiro. -- Rio de
Janeiro, 2020.
96 f.

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz.
Coorientadora: Ana Carolina Sampaio Doria
Chaves.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2020.

1. análise sensorial. 2. CATA. 3. proteólise. 4.
índice de maturação. 5. terroir. I. Koblitz, Maria
Gabriela Bello , orient. II. Chaves, Ana Carolina
Sampaio Doria , coorient. III. Título.

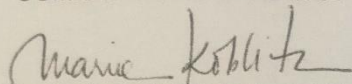
Juliana de Oliveira Carneiro

ESTUDO DA MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO

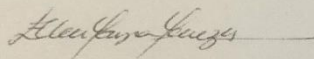
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Aprovada em: 16 de outubro de 2020.

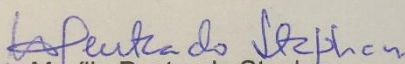
COMISSÃO EXAMINADORA



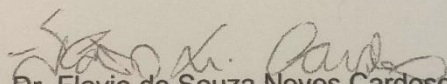
Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



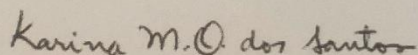
Dra. Ellen Mayra Ayres Menezes – PPGAN
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dra. Marília Penteado Stephan
Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária – EMBRAPA



Dr. Flavio de Souza Neves Cardoso
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dra. Karina Maria Olbrich dos Santos
Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária – EMBRAPA

Rio de Janeiro
2020

À minha mãe
Maria de Lourdes
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me dado a oportunidade de realizar esse doutorado;

À minha mãe (*in memorian*), que sempre acreditou em mim e me apoiou nos meus sonhos, a saudade é eterna;

Ao meu pai, por todos os ensinamentos;

Às minhas irmãs, por todo apoio e torcida;

À minha sobrinha Maria Catarina, por permitir que eu aflore o meu lado infantil;

À minha coorientadora Carol, pela amizade, ensinamentos, compreensão e paciência;

À minha orientadora Gabriela, por ter acreditado nesse projeto, pelo apoio e aprendizado;

Aos produtores de queijo artesanal da cidade do Serro por terem aceitado participar da pesquisa;

Às pesquisadoras da EMPRAPA, Dra. Marília Penteado e Dra. Daniela de Freitas, pelas contribuições à pesquisa;

À EMBRAPA, pela disponibilização das instalações e pela oportunidade de realização desta pesquisa;

Aos professores do PPGAN, pelos ensinamentos;

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de participar;

À minha amiga Olga e ao amigo Gabriel, pela amizade e apoio de sempre;

Às amigas Elisama e Gal, por terem me dado guarida quando precisei.

CARNEIRO, Juliana de Oliveira. **Estudo da maturação do queijo Minas artesanal do Serro**. UNIRIO, 2020. 96 páginas. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UNIRIO.

RESUMO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é o mais antigo e tradicional queijo brasileiro, sendo produzido em várias regiões do estado de Minas Gerais, dentre elas, o Serro. O QMA do Serro é um produto tombado como patrimônio imaterial e possui selo de Indicação Geográfica (IG). O QMA do Serro é produzido a partir de leite cru, utiliza-se o 'pingo', como inóculo, e coalho comercial. O 'pingo' é um soro-fermento salgado com diferentes bactérias lácticas, que é obtido da dessoragem dos queijos fabricados no dia anterior. Segundo a legislação vigente, o QMA do Serro deve ser produzido e maturado na propriedade de origem por, pelo menos, 17 dias. No processamento do QMA típico, a casca é lavada a cada 2 ou 3 dias, durante a maturação. No entanto, alguns produtores da região têm optado por não realizar a lavagem da casca, resultando em um queijo diferenciado, com a casca fungada. Esta pesquisa teve como objetivo estudar o processo de maturação do QMA do Serro produzido no inverno e no verão, em condições ambientais, de temperatura e umidade não controladas, ao longo de 60 dias, avaliando a influência da etapa de lavagem da casca nas características finais do produto. Para avaliar essa alteração na etapa de maturação do QMA do Serro, foram utilizadas diferentes técnicas analíticas. As amostras foram submetidas às seguintes análises: eletroforese TRICINE-SDS-PAGE, determinação dos índices de extensão e de profundidade de proteólise; teor de umidade e firmeza instrumental. A análise sensorial foi realizada por meio de testes de aceitação, da aparência e de aroma/sabor/textura, e aplicação de questionário CATA para levantar os atributos de aroma, sabor, cor, textura e aparência para caracterização das amostras. Os resultados demonstraram que houve diferença maior entre os produtores do que ao longo do tempo de maturação. A ausência da lavagem da casca ocasionou modificações significativas nas características dos queijos, tanto nas relacionadas ao perfil de proteólise, quanto em relação às características sensoriais e análises instrumentais. Os queijos tiveram diferentes perfis de proteólise. Houve diminuição de umidade e aumento de firmeza instrumental ao longo da maturação. Os queijos com a casca fungada não tiveram a aparência aceita, mas as características de sabor/aroma/textura agradaram aos consumidores. No inverno os queijos mais aceitos foram os maturados por 17 dias, que foram descritos como "macio", "cremoso" e tendo "aspecto úmido", enquanto no verão, os queijos maturados por 30 e 60 dias tiveram maior aceitação e foram descritos como "ressecados", "firmes" e com a "crosta grossa". Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o *terroir* dos QMAs está ligado ao local de produção do leite, do queijo e da manipulação ao longo da maturação, visto que os queijos estudados de três propriedades da mesma região apresentaram características finais distintas.

Palavras-chave: análise sensorial, CATA, proteólise, índice de maturação, *terroir*.

CARNEIRO, Juliana de Oliveira. **Study of ripening of artisan Minas cheese of Serro**. UNIRIO, 2020. 96 pages. Doctoral thesis. Department of Food Science and Technology, UNIRIO.

ABSTRACT

The Artisan Minas Cheese (AMC) is the oldest and most traditional Brazilian cheese, it is produced in several regions of the state of Minas Gerais, among them, the Serro, which was the object of this research. AMC-Serro is a product registered as an intangible heritage and has a Geographical Indication (IG) seal. AMC-Serro is produced from raw milk, using the *pingo* as an inoculum and commercial rennet. The *pingo* is a salted whey with endogenous bacteria drained from the cheese made the day before. According to the current legislation, AMC-Serro must be ripened on the original farm for at least for 17 days. In the processing of the typical AMC-Serro, the rind is washed every 2 or 3 days, however, some producers in the region have chosen not to wash the rind, resulting in a differentiated cheese, with a fungus rind. This research aimed to study the ripening process of AMC-Serro under uncontrolled temperature and humidity at room conditions, over 60 days, evaluating the influence of the rind washing step on the final characteristics of the product. To assess this change in AMC processing, different analytical techniques were used. The samples were subjected to the following analyzes: TRICINE-SDS-PAGE electrophoresis, determination of proteolysis extension and depth indices; moisture content and instrumental firmness. Sensory analysis was performed through acceptance tests, appearance, and color/aroma/flavor/texture, and CATA questions was also applied to survey the attributes of taste, color, texture and appearance to characterize the cheeses. The results showed that the differences were greater due to the producers rather than to the ripening time. The absence of rind washing caused significant changes in the characteristics of the cheeses, both in terms of the proteolysis profile and in relation to the sensory and instrumental characteristics. The cheeses had different proteolysis profiles. There was a decrease moisture and an increase in instrumental firmness throughout ripening. In winter the most accepted cheeses were those ripened for 17 days, which were described as "soft", "creamy" and being "moist appearance", while in summer, cheeses ripened for 60 days were more accepted and described as "dried up", "firm", and having a "thick crust". According to the results obtained in this study, it is possible to suggest that the AMCs terroir is linked to the place of milk production, cheese producing and ripening, the cheeses studied were from three farms in the same region but they had really different final characteristics.

Keywords: sensory analysis, CATA, proteolysis, ripening index, terroir.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| Referências | 14 |
| OBJETIVOS | 15 |
| <i>Objetivo geral.....</i> | <i>15</i> |
| <i>Objetivos específicos.....</i> | <i>15</i> |
| Capítulo 1 | 16 |
| Revisão de Literatura: Queijo Minas Artesanal do Serro..... | 17 |
| 1. Queijos artesanais | 17 |
| 2. Queijo Minas Artesanal | 18 |
| 3. Processo de maturação do queijo..... | 19 |
| 4. Legislação | 22 |
| 5. Microbiota dos queijos artesanais | 23 |
| 6. Queijo Minas Artesanal do Serro..... | 24 |
| <i>6.1. A região do Serro.....</i> | <i>24</i> |
| <i>6.2. Produção do Queijo Minas Artesanal do Serro.....</i> | <i>25</i> |
| <i>6.3. Qualidade de QMA do Serro.....</i> | <i>28</i> |
| <i>6.4. Inovações na produção de Queijo Minas Artesanal do Serro.....</i> | <i>30</i> |
| Conclusão..... | 32 |
| Referências..... | 32 |
| Capítulo 2 | 39 |
| Optimization of the Electrophoresis Tricine-SDS-PAGE for Simultaneous Detection of Protein and Peptide in Artisanal Cheese..... | 40 |
| Abstract | 40 |
| 1. Introduction | 40 |
| 2. Materials and Methods | 41 |
| 3. Results and Discussion..... | 42 |
| 4. Conclusions..... | 45 |
| References..... | 45 |
| Capítulo 3 | 47 |
| Artisan Minas Cheese of Serro: Proteolysis during ripening..... | 48 |
| Abstract | 49 |
| INTRODUCTION..... | 50 |
| MATERIALS AND METHODS | 51 |

| | |
|--|----|
| <i>Sampling</i> | 51 |
| <i>Preparation of extracts</i> | 52 |
| <i>TRICINE-SDS-PAGE</i> | 52 |
| <i>Proteolysis extension and depth indices</i> | 53 |
| <i>Moisture and firmness</i> | 54 |
| <i>Statistical analysis</i> | 54 |
| RESULTS | 54 |
| <i>TRICINE-SDS-PAGE</i> | 54 |
| <i>Proteolysis and ripening extension and depth indices</i> | 57 |
| <i>Moisture and firmness</i> | 57 |
| DISCUSSION | 59 |
| <i>TRICINE-SDS-PAGE</i> | 59 |
| <i>Ripening extension and depth indices</i> | 61 |
| <i>Moisture and firmness</i> | 63 |
| CONCLUSION | 64 |
| REFERENCES | 65 |
| Capítulo 4 | 69 |
| Sensory evaluation of Artisan Minas Cheese of Serro over 60 days of ripening using CATA questions | 70 |
| Abstract | 70 |
| INTRODUCTION | 71 |
| MATERIALS AND METHODS | 72 |
| <i>Sampling</i> | 72 |
| <i>Consumers</i> | 73 |
| <i>Sensory Analyses</i> | 74 |
| <i>Data analysis</i> | 75 |
| RESULTS AND DISCUSSION | 76 |
| CONCLUSION | 83 |
| REFERENCES | 84 |
| CONCLUSÃO GERAL | 88 |
| Anexo | 89 |
| Método de Eletroforese de Proteínas TRIS/TRICINA Modificado para Identificação da Hidrólise das Caseínas ao Longo da Maturação de Queijos | 90 |

INTRODUÇÃO GERAL

O queijo Minas Artesanal é o queijo mais conhecido e um dos principais produtos artesanais brasileiros. Acredita-se que a produção de queijo no Brasil, tenha iniciado no estado de Minas Gerais com os imigrantes portugueses, durante o ciclo da mineração do ouro, no século XVIII (Martins, 2006). Trata-se, portanto, de um produto com três séculos de história e cultura. Apesar disso, ainda há pouca informação científica sobre este queijo. Atualmente, Minas Gerais tem sete regiões tradicionais produtoras de queijo, dentre elas, destaca-se a região do Serro.

Por sua importância histórica, em 2008, a forma de produzir o queijo Minas foi tombada como Patrimônio Imaterial do Brasil pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) (IPHAN, 2008; Monteiro, 2018). Em 2011, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) concedeu ao Queijo Minas Artesanal do Serro um selo de Indicação Geográfica (IG), sendo o primeiro queijo brasileiro a receber tal distinção (INPI, 2011).

Por ser produzido a partir de leite cru, a comercialização do queijo Minas artesanal foi proibida durante muito tempo, sendo considerada uma atividade clandestina, uma vez que, a legislação brasileira exige que queijos produzidos com leite cru sejam maturados por, no mínimo, 60 dias (Brasil, 1996). De forma geral, os queijos artesanais são comercializados frescos ou maturados por períodos inferiores aos exigidos pela legislação vigente.

Na fabricação do queijo Minas artesanal, além de leite cru, emprega-se o 'pingo', como inóculo. O 'pingo' é o soro-fermento obtido da dessoragem dos queijos produzidos no dia anterior. Outra característica deste queijo é que, durante a maturação, ocorre a lavagem da casca a cada 2 ou 3 dias. Porém, alguns produtores do Serro têm optado pela não realização desta etapa, o que originou um novo tipo de queijo na região, o queijo com casca fungada, este novo produto tem agradado aos consumidores, agregando valor e inovação ao queijo artesanal mineiro, porém, ainda não foi devidamente estudado.

Nos últimos anos, muitos consumidores brasileiros passaram a ter maior interesse por produtos artesanais, valorizando os queijos artesanais nacionais. Devido ao fato de serem processados com leite cru e às condições processamento, estes queijos estão sujeitos à maior contaminação microbiológica, que pode ocorrer nas diferentes etapas de produção, desde a

obtenção do leite cru até o manuseio do queijo durante a maturação. Além disso, o queijo pode estar associado a diferentes tipos de zoonoses e, portanto, é de extrema importância que se cumpram requisitos em relação à saúde pública, segurança microbiológica e padronização da qualidade de forma geral, deste produto.

Tendo em vista a possibilidade de comercializar queijos artesanais fora do estado de Minas Gerais, devido ao reconhecimento pelo mercado brasileiro e à mudança na legislação, os produtores se viram diante da possibilidade de expandir seus negócios e ampliar a captação de recursos. Entretanto, para isso, é necessário ajustar as técnicas de fabricação para atender à legislação e, também, às exigências dos clientes.

Nos últimos 10 anos, vários estudos foram realizados com o objetivo de avaliar a qualidade e a segurança microbiológica destes queijos, alguns deles foram utilizados para subsidiar a legislação e determinar o tempo mínimo de maturação do QMA do Serro para ser considerado microbiologicamente seguro (Santos, 2010; Nobrega, 2012; Martins et al., 2014; Figueiredo et al., 2015; Duch, 2015). No entanto, estes estudos foram conduzidos com os queijos maturados em laboratório, sob condições controladas de temperatura e umidade. De acordo com a legislação vigente, os queijos artesanais devem ser maturados na propriedade de origem em temperatura ambiente, o que ocasiona uma variação maior nas características do que as que ocorrem quando os queijos são maturados em uma câmara com condições controladas.

Essa foi a primeira pesquisa realizada para estudar os QMA's do Serro maturados na propriedade de origem, com leite cru, em condições ambientais não controladas, nas chamadas “sala dos queijos” ou “sala de maturação”. Tanto dos queijos de casca lavada a cada três dias (QMA do Serro típico), quanto dos queijos sem a etapa de lavagem, queijos com casca fungada, que são uma inovação na região.

Esta tese faz parte do projeto “Determinação do período mínimo de maturação para garantir a segurança microbiológica e a qualidade do Queijo Minas Artesanal do Serro” – MINASERRO, da Embrapa Agroindústria de Alimentos, iniciado em 2016, em parceria com a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Como resultado deste projeto, além dessa Tese de doutorado, foram produzidas duas dissertações de Mestrado no

Departamento de Zootecnia da UFVJM, em Diamantina (MG), localizada próxima ao município do Serro. Nestas dissertações, as amostras de QMA do Serro que foram utilizadas no presente estudo, foram avaliadas quanto às características físico-químicas e microbiológicas ao longo da maturação, em duas estações do ano. A primeira dissertação caracterizou os queijos produzidos no inverno de 2018 e, a segunda, os queijos produzidos no verão de 2019. Os estudos foram realizados por Figueiredo (2018) e Peres (2019) e alguns resultados destes estão apresentados no Capítulo 1 – Revisão de Literatura, da presente tese.

Essa tese de doutorado está estruturada da seguinte forma:

- Capítulo 1: Revisão de Literatura sobre o queijo Minas artesanal do Serro, nesta revisão são apresentados os principais estudos já realizados com o QMA do Serro, será formatada para submissão na Revista Research, Society and Development;
- Capítulo 2: Artigo científico intitulado *Optimization of the Electrophoresis Tricine-SDS-PAGE for Simultaneous Detection of Protein and Peptide in Artisanal Cheese* publicado pela Journal of Agricultural Science and Technology B. Este trabalho teve como objetivo otimizar o método de eletroforese (Tricine-SDS-PAGE) para monitorar a grau de hidrólise das caseínas durante o período de maturação do queijo artesanal, com esta otimização, a imagem das proteínas e dos peptídeos nos géis de poliacrilamida foi melhorada, a retirada da gordura das amostras possibilitou uma adequada corrida dos géis, proporcionando a visualização clara das diferentes bandas de proteínas e peptídeos;
- Capítulo 3: Artigo científico intitulado *Artisan Minas cheese of Serro: proteolysis during ripening* publicado pela revista Heliyon. Este trabalho avaliou a proteólise do QMA do Serro dos três produtores, durante 60 dias de maturação e relacionou a proteólise com as fazendas produtoras, a época de produção e a lavagem da casca durante a maturação, concluiu-se que o perfil de proteólise dos queijos foi influenciado pelos seguintes fatores: temperatura, umidade dos queijos, localização da sala de maturação, época de produção e lavagem da casca;
- Capítulo 4: Artigo científico intitulado *Sensory evaluation of Artisan Minas Cheese of Serro over 60 days of ripening using CATA questions*

submetido à revista British Food Journal. Este estudo teve como objetivo caracterizar sensorialmente o QMA do Serro de três produtores durante os 60 dias de maturação, no inverno e no verão, os resultados demonstraram que houve diferença entre os queijos dos diferentes produtores com relação à aceitação da aparência e de sabor/aroma/textura e caracterização dos atributos através do CATA;

- Conclusão geral: resumo das principais conclusões desta pesquisa;
- Anexo: Comunicado Técnico da EMBRAPA intitulado *Método de Eletroforese de Proteínas TRIS/TRICINA Modificado para Identificação da Hidrólise das Caseínas ao Longo da Maturação de Queijos*. Este comunicado teve como objetivo apresentar a técnica de eletroforese TRIS/TRICINA modificada pela inclusão da etapa de retirada da gordura das amostras de queijo modificada, que se mostrou eficiente na identificação das diferentes frações de proteína (com bandas claras e sem distorções).

Referências

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 146** de 07 de março de 1996. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 12/08/2020.

INPI. 2011. **IG201001: Indicação Geográfica – Serro**. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), Brasília, DF.

IPHAN. 2006. Parecer nº 006/2006: Processo no 01450.012192/2006-65 referente ao **Registro dos Queijos Artesanais de Minas**, a ser inscrito no Livro dos Saberes. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), Brasília, DF.

Martins, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro**. 158 p. 2006. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

Monteiro, R.P. O Queijo Minas Artesanal e seu Potencial para a Agroindústria Familiar, Monteiro, R.P.; Matta, V.M. (Ed.). **Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar**, Embrapa, Brasília, DF, p.11-14, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf>>. Acesso em: 10/09/2020.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar o processo de maturação do queijo Minas artesanal do Serro ao longo de 60 dias, avaliando a influência do tempo, dos produtores (maturação em condições ambientais) e da etapa de lavagem da casca nas características finais do produto.

Objetivos específicos

- Avaliar a proteólise do queijo ao longo do período de maturação;
- Avaliar a aceitação dos queijos maturados por diferentes períodos;
- Determinar a umidade e firmeza instrumental dos queijos;
- Caracterizar sensorialmente os queijos ao longo do período de maturação;
- Comparar as características de maturação do QMA produzidos por diferentes produtores;
- Comparar as características de maturação do QMA produzido em duas épocas do ano (inverno e verão).

Capítulo 1

Revisão de Literatura: Queijo Minas Artesanal do Serro

1. Queijos artesanais

Não se conhece exatamente a origem dos queijos, os primeiros foram produzidos utilizando-se leite cru e com a produção do ácido láctico a partir da fermentação espontânea pelas bactérias lácticas naturalmente presentes no leite. Após a fermentação, separava-se a caseína coagulada do soro, o queijo era moldado, prensado e salgado, esta última etapa tinha o objetivo de preservar o produto (Bachmann et al., 2011).

A longa história de fabricação de queijos em diferentes países europeus é responsável pela forte tradição do consumo de queijos de leite cru na Europa. Países como França, Itália, Espanha, Grécia e Suíça possuem vasta tradição na fabricação de queijos de leite cru com diferentes *terroirs*, vários destes queijos são registrados como produtos com Designação de Origem Protegida (DOP) (Bachmann et al., 2011; Montel et al., 2014).

De acordo com a Lei Federal 13.860/2019, o queijo artesanal deve ser elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, com emprego de Boas Práticas Agropecuárias e Boas Práticas de Fabricação (Brasil, 2019).

Os queijos artesanais têm sido objeto de inúmeros estudos devido à importância econômica e social para as regiões onde são produzidos. Reconheceu-se que estes queijos constituem um nicho de mercado importante, os produtores podem ter vantagem competitiva, melhorando e padronizando a qualidade do produto (Murphy et al., 2016). A cadeia dos queijos artesanais tem grande importância social devido ao fato de permitir a manutenção dos produtores e suas famílias nas regiões de origem, mantendo a tradição histórica e cultural da arte de fazer queijo (Pinto, 2009).

A prática queijeira brasileira se difundiu por todo o território nacional, em pequenas propriedades rurais, gerando produtos variados, apesar disso, ainda é pouco documentada, provavelmente, devido ao caráter informal de muitos destes produtos (Nobrega, 2012).

Em diferentes regiões do mundo, assim como no Brasil, queijos de leite de vaca, cabra e ovelha são produzidos em fazendas seguindo técnicas

tradicionais e sem adição de bactérias lácticas industriais, estes queijos são conhecidos como queijos artesanais ou tradicionais (Randazzo et al., 2009; Montel et al., 2014).

2. Queijo Minas Artesanal

Minas Gerais é o principal estado produtor de queijos do Brasil, tem a maior produção e comercialização, além de possuir uma grande variedade de queijos artesanais de leite cru (Martins et al., 2015; Monteiro e Chaves, 2018; Sant'Anna et al., 2019). Os queijos mineiros representam um dos mais antigos e tradicionais produtos artesanais fabricados no Brasil, são nomeados de acordo com a região de origem e, em geral, constituem a principal fonte de renda e subsistência de muitos produtores rurais do estado (Cardoso et al., 2013; Andretta et al., 2019).

A legislação estadual mineira define queijo artesanal como o queijo elaborado com leite integral fresco, cru e com características de identidade e qualidade específicas (Minas Gerais, 2018). De acordo com a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater-MG), o Queijo Minas Artesanal é elaborado em estabelecimento individual ou coletivo, a partir do leite cru, hígido, integral e recém ordenhado, utiliza-se para fermentação, o 'pingo'; para a coagulação, o coalho industrial e, na prensagem, é permitido apenas o processo manual. O produto deverá apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde foi produzido (Emater, 2020). O 'pingo' é o soro salgado e fermentado, obtido ao final da dessoragem dos queijos artesanais do dia anterior, é armazenado até o dia seguinte, à temperatura ambiente, possui elevado teor de sal e uma microbiota endógena que atua como cultura *starter* na produção do queijo (Castro et al., 2016; Emater, 2020).

Devido à importância histórica do QMA, em 2008, o modo artesanal de fazer queijo Minas foi reconhecido como patrimônio imaterial do Brasil pelo Instituto do Patrimônio Histórico Artístico e Natural (IPHAN), como uma forma de preservar este conhecimento, o "saber fazer", que foi passado de geração para geração (IPHAN, 2008). Estes queijos sobreviveram às pressões dos processos produtivos, não somente pelo apego às tradições, mas também, devido ao

isolamento das propriedades produtoras de queijo, que ficam dispersas nas colinas e vales do estado de Minas Gerais. As distâncias entre as propriedades rurais, as condições peculiares de cada uma delas contribuíram para a preservação das características próprias e únicas destes queijos, além do grande valor cultural e econômico (EMATER, 2011).

As principais regiões tradicionais de Minas Gerais são Serro, Araxá, Serra da Canastra, Cerrado, Triângulo Mineiro e Campo das Vertentes, sendo que, os queijos mais famosos e consumidos são os da Canastra e do Serro. Os queijos das diferentes regiões têm características que variam em função do clima, altitude, relevo, vegetação (alimentação do rebanho), temperatura e microbiota endógena existente em cada local (Licitra et al., 2019). Estas características resultam em sabores diferenciados e peculiares que podem ser chamadas de *terroir* (Campagnollo et al., 2018; Andretta et al., 2019; Sebrae, 2020). *Terroir* é uma característica individual de uma determinada região que está relacionada ao território e ao ambiente particular, que irá expressar as peculiaridades de um produto, tornando-o único (Tonietto, 2007). A definição e o entendimento da atuação da microbiota ao longo da maturação dos queijos artesanais podem contribuir para estabelecer as indicações geográficas, a exemplo do que ocorre na Europa (Sant'Anna et al., 2019).

3. Processo de maturação do queijo

A maturação pode alterar significativamente as características e agregar valor aos queijos artesanais. Este período promove alterações que resultam no desenvolvimento das características sensoriais de sabor, textura, aparência e aroma do queijo, podendo variar de alguns dias a mais de 2 anos (McSweeney, 2004; Johnson, 2017). Os queijos artesanais produzidos com leite cru possuem sistemas complexos que resultam em características sensoriais únicas influenciadas pelo local de produção e de maturação; pelas variações edafoclimáticas locais; pela microbiota endógena e pelas características do leite *in natura* e variam com a tradição de cada produto (Licitra, 2010; Martins et al., 2015).

O processo de maturação dos queijos envolve inúmeras alterações microbiológicas, químicas, físicas e bioquímicas realizadas sob a influência dos

fatores ambientais, da ação de diferentes enzimas atuando nos principais compostos dos queijos e ácidos orgânicos produzidos, pela microbiota naturalmente presente no leite cru ou adicionada. As alterações promovidas ao longo da maturação são importantes para o desenvolvimento das diferentes características de cada tipo de queijo (Dolci et al., 2010; Sihufe et al., 2010; Costa Júnior et al., 2014; Cardoso et al., 2015).

Nesta etapa, ocorre uma série de fenômenos complexos, com inúmeras reações químicas e bioquímicas que formam diferentes metabólitos provenientes da hidrólise da lactose, da gordura e das proteínas, resultando na formação de cetonas, ácidos graxos livres, peptídeos e aminoácidos que irão conferir o sabor, o aroma e interferir na textura. Durante a maturação, ocorrem, ainda, alterações nas características intrínsecas do queijo como no pH, umidade e atividade de água (Fox et al., 2004). É importante salientar que a acidez exerce influência na multiplicação dos microrganismos e na atividade enzimática ao longo da maturação (Lavasani et al., 2011).

O metabolismo da lactose é resultado da ação dos microrganismos presentes no leite e, no caso do QMA do Serro, da microbiota do 'pingo'. As bactérias lácticas produzem ácido láctico a partir da fermentação da lactose, embora, a maior parte seja eliminada no soro, 1 a 2% da lactose permanece no queijo fresco, sendo quase totalmente metabolizada pelas bactérias lácticas, em cerca de 12 horas (Fox et al., 2004a).

A lipólise é limitada na maioria dos queijos, devido ao fato das bactérias lácticas serem fracamente lipolíticas, no entanto, a gordura do leite exerce importante papel no desenvolvimento do sabor do queijo durante a maturação, podendo gerar sabores, tanto desejáveis, quanto indesejáveis (Giazzi et al., 2020). A presença de esterases e lipases promove a liberação de ácidos graxos ao longo da maturação e, quando são de cadeia curta, geram um sabor desagradável ao queijo, conhecido como ranço, um defeito que pode ser gerado pela rancidez oxidativa ou hidrolítica (Collins et al., 2003). A oxidação lipídica não ocorre de forma significativa em queijos, porém, a rancidez hidrolítica, devido à ação de lipases, acontece mais frequentemente, sendo a principal responsável pela formação dos sabores indesejáveis (Sobral et al., 2017).

Entre as reações que ocorrem durante a maturação, a mais complexa e importante é a proteólise, uma vez que, ela é a principal responsável pela

modificação da textura, tornando o queijo mais macio, liso e cremoso, além de contribuir, significativamente, no desenvolvimento do sabor. Segundo Fox et al. (2004b), a proteólise contribui na maturação de queijos de maneiras distintas, podendo contribuir diretamente na formação dos compostos de sabor característicos ou na formação de sabor amargo residual, ou indiretamente, via catabolismo de aminoácidos, aminas, ácidos, tióis e tioésteres, entre outros. Ocorre o aumento da liberação de compostos de sabor durante a mastigação e a modificação da textura devido à hidrólise da rede proteica. Também ocorre o aumento do pH, da ligação com a água e formação de grupos aminas e carboxilas, via formação de amônia (NH_3). A proteólise excessiva é responsável pelo defeito de formação de peptídeos pequenos que conferem sabor residual amargo (Fox e McSweeney, 1998; Fox et al., 2004b).

As enzimas responsáveis pela maturação dos queijos podem ser provenientes de diversas fontes, tais como, o coagulante adicionado ao leite, que são proteases de origem animal, microbiana ou vegetal; o metabolismo dos microrganismos, originalmente presentes no leite cru, adicionados (bactérias lácticas) ou de outros microrganismos que se multiplicam no interior e/ou na superfície dos queijos (bolos, leveduras ou bactérias, o fermento secundário); além das enzimas naturalmente presentes do leite (como a plasmina) e enzimas produzidas pelos microrganismos adicionados, ou ainda, pelos contaminantes (Fox, 1993; Johnson, 2017).

Diferentes microrganismos desempenham um papel fundamental na maturação dos queijos (Beresford et al., 2001). Na fabricação do queijo com leite cru, os microrganismos presentes no leite migram para a massa do queijo e podem se multiplicar durante a maturação, alguns permanecem no produto, enquanto outros são eliminados ao longo deste processo (Perin, 2019). As mudanças microbiológicas incluem a morte e lise das células das bactérias lácticas e a multiplicação da microbiota secundária presente no produto (McSweeney, 2004). O processo de maturação pode, ainda, contribuir para a redução de microrganismos patogênicos presentes no queijo (Brant et al., 2007).

A microbiota dos queijos Minas artesanais é influenciada diretamente pelos microrganismos presentes no leite cru e no 'pingo', essenciais para a maturação. Características como localização geográfica, umidade e acidez estão fortemente ligadas à composição da microbiota e ao tempo de maturação. Vários

fatores como fonte da matéria-prima, práticas de fabricação e características ambientais da região podem determinar a diversidade e a dinâmica das culturas microbianas, bem como, as características sensoriais e a qualidade dos produtos (Sant'Anna, et al., 2019). A microbiota endógena é única e característica de cada região e de cada propriedade produtora de queijo artesanal, resultando no *terroir* típico de cada tipo de queijo (Montel et al., 2014).

4. Legislação

Ao longo do tempo, a legislação brasileira teve inúmeras alterações em relação à produção dos queijos, em especial, aos artesanais. Nos últimos anos, várias ações têm sido realizadas para tentar retirar os queijos artesanais da informalidade/clandestinidade e permitir que estes produtos possam ser comercializados em diferentes estados. Com a criação do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em 1952, diversos queijos foram agrupados na categoria de queijos Minas artesanais. Posteriormente, em 1962, o decreto 1.255 estabeleceu que estes queijos só poderiam ser comercializados 10 dias após a fabricação.

Foi a partir de 1996 que a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu que o período mínimo de maturação para queijos elaborados a partir de leite cru deveria ser, no mínimo, de 60 dias (Brasil, 1996). Porém, na maioria dos queijos artesanais, ou essa etapa é inexistente ou é realizada por um período não superior a 8 dias, ou seja, inferior ao estabelecido pela legislação. Após 60 dias de maturação, a maioria dos queijos tornam-se secos e duros, com características físico-químicas e sensoriais diferentes dos QMA's tradicionalmente consumidos e comercializados há 300 anos (Dores, 2013). Além disso, a maioria das propriedades rurais não tem infraestrutura e nem recursos financeiros para maturar os queijos por longos períodos.

Com o objetivo de possibilitar a produção e a comercialização de queijos artesanais, em 2013, por meio da Instrução Normativa (IN) Nº 30, o MAPA passou a permitir a produção de queijos artesanais tradicionais elaborados a partir de leite cru e maturados por período inferior a 60 dias. Porém, a redução do tempo de maturação, deveria ser amparada por estudos técnico-científicos que comprovassem que esta redução não comprometeria a inocuidade e a

qualidade dos queijos. Esta permissão ocorreu após o reconhecimento dos queijos artesanais como patrimônio imaterial brasileiro e estava restrita às queijarias situadas em regiões com indicação geográfica registrada ou em regiões produtoras tradicionalmente reconhecidas, como é o caso da região do Serro (Brasil, 2013).

Em seguida, também em 2013, a Portaria nº 1305 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) estabeleceu as diretrizes para o tempo de maturação e definiu 17 dias como o período mínimo de maturação para o QMA do Serro. A portaria exige, ainda, o cadastro das queijarias artesanais e certificação da qualidade dos produtos, sob responsabilidade dos proprietários (Minas Gerais, 2013; Monteiro e Chaves, 2018). O IMA estabeleceu o período mínimo para maturação do QMA do Serro com base em pesquisa científica realizada por Martins (2006). Segundo este estudo, o período mínimo de maturação deveria ser de 17 dias, porém, essa pesquisa não é suficiente para respaldar a legislação, uma vez que, a maturação dos queijos utilizados na pesquisa foi realizada em condições controladas, dentro de laboratórios, e não nas propriedades produtoras de QMA, conforme exige a legislação.

Em 2018, a Lei Federal 13.680, Lei do Selo Arte, permitiu a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, com características e métodos tradicionais ou regionais próprios, desde que, sejam empregadas as Boas Práticas Agropecuárias e as Boas Práticas de Fabricação. A fiscalização destes produtos é de responsabilidade dos órgãos de saúde pública estaduais (Brasil, 2018).

Por fim, em 2019, a Lei Federal Nº 13.860, específica para os queijos artesanais, estabeleceu que o tempo de maturação de queijo produzido a partir de leite cru deve ser definido com base no processo tecnológico de produção de cada variedade, de acordo com suas características, e permitiu a comercialização em todo o território nacional (Brasil, 2019).

5. Microbiota dos queijos artesanais

A microbiota do leite cru é rica e diversificada, possui microrganismos de fontes que tiveram contato direto com o leite, como a teta do animal e os equipamentos, e de fontes indiretas, como a alimentação e a água utilizada na higienização (Montel et al., 2014). Entre os microrganismos que ocorrem

naturalmente no leite cru, as bactérias lácticas são as predominantes e essenciais para a maturação, influenciam nas características bioquímicas e sensoriais dos queijos. Os principais gêneros são *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. (Perin et al., 2019).

O leite pode conter, ainda, bactérias patogênicas, as mais frequentemente encontradas são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. A presença de *Staphylococcus* spp. em queijos artesanais é bastante comum, isso se deve pela fabricação dos queijos artesanais ser caracterizada pela manipulação direta pelos produtores, o que aumenta o risco de transferência de *Staphylococcus* spp. para os queijos através de utensílios, superfícies dos equipamentos e dos funcionários, pois este gênero é encontrado na pele e mucosas de animais e humanos (Basanisi et al., 2016; Johnson, 2017).

O 'pingo' contém diversos grupos microbianos que afetam a maturação do queijo, conferindo ao produto uma microbiota diversificada, representativa da região na qual o produto é fabricado e confere aos queijos características sensoriais diferenciadas (Nobrega, 2012). A microbiota do 'pingo', sem qualquer tipo de contaminação, é composta basicamente por bactérias lácticas (Chaves et al., 2018).

6. Queijo Minas Artesanal do Serro

6.1. A região do Serro

A região do Serro é considerada uma das mais importantes dentre as regiões produtoras de queijo artesanal no Brasil, devido à sua história, tradição e cultura (Oliveira et al., 2019). Está situada no estado de Minas Gerais, no Médio Espinhaço e no Alto Vale do Jequitinhonha. É uma região extensa, com cerca de 2.258 km² e composta por 11 municípios, a saber, Serro, Rio Vermelho, Serra Azul de Minas, Santo Antônio do Itambé, Materlândia, Paulistas, Coluna, Sabinópolis, Alvorada de Minas, Dom Joaquim e Conceição do Mato Dentro (Minas Gerais, 2011). A população destes municípios varia de 3.600 a 18.000 habitantes. O Serro é uma cidade histórica, faz parte do Circuito Estrada Real e é caracterizada por suas ricas tradições e valores culturais (Nunes e Melo, 2013). A cidade do Serro está situada a 795 m acima do nível do mar, tem inverno seco

e frio e o verão é úmido e relativamente quente. A temperatura média é de 20,5°C e a pluviosidade média é de 1.471 mm, durante o ano (Climate-data, 2020).

A fabricação de queijo nesta região é antiga, possui quase 300 anos de história e é fundamentada no “saber fazer”, transmitido de geração para geração ao longo dos anos. Em 2008, o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) reconheceu o QMA do Serro como um patrimônio imaterial do Brasil (IPHAN, 2008; Silva et al., 2011). Devido às suas características peculiares, em 2011, o QMA do Serro recebeu o certificado de Indicação Geográfica (IG), com o objetivo de garantir a qualidade do produto, proteger o “saber fazer” e a tradição local, bem como, resguardar o consumidor de possíveis fraudes, sendo o primeiro queijo brasileiro a receber tal distinção (INPI, 2011; Silva et al., 2011; Monteiro, 2018). Com este reconhecimento, foi possível agregar valor ao produto, que rapidamente se tornou mais valorizado no mercado, além de garantir a qualidade e a procedência (Emater, 2011). A cada dia, os queijos artesanais/regionais, em especial, os que possuem IG, têm ganhado mais valor no mercado, sendo comercializados por preços elevados em lojas especializadas nas grandes capitais, como Belo Horizonte, São Paulo e Rio de Janeiro.

Em levantamento realizado pelo IMA, 245 propriedades rurais de Minas Gerais encontravam-se cadastradas no órgão, destas, quase 50% estão situadas na microrregião do Serro, o que ressalta a importância desta região na produção de QMA (IMA, 2020). Estima-se que o número de produtores de queijo no estado seja muito superior, porém, devido à informalidade, é difícil saber o número exato de produtores rurais que se dedicam à esta atividade. O número de propriedades cadastradas tem aumentado gradualmente nos últimos anos, no entanto, grande parte das propriedades ainda não tem condições de se cadastrar, pois não conseguem atender às exigências da legislação brasileira.

6.2. Produção do Queijo Minas Artesanal do Serro

A fabricação de QMA do Serro é um processo basicamente manual, artesanal e, por isso, sujeito a vários tipos de contaminação microbiológica. Com exceção da ordenha mecânica, não se emprega nenhum outro tipo de mecanização no processamento deste queijo, trata-se, portanto, de um processamento de difícil padronização (Brant et al., 2007).

O QMA do Serro é produzido utilizando-se leite cru recém-ordenhado e um fermento láctico natural, popularmente chamado de 'pingo' (Furtado, 1980). O nome 'pingo' se deve ao fato de que o soro que se separa da massa enformada escorre pela bancada, que é construída com ligeira declividade para permitir a coleta do 'pingo' que goteja, ou seja, o soro pinga em um recipiente coletor. O 'pingo' do queijo fabricado num dia, será utilizado no processamento do lote de queijo do dia seguinte. Este soro-fermento possui uma elevada concentração de cloreto de sódio e de bactérias lácticas endógenas da região onde o queijo é produzido, são responsáveis pelas características sensoriais de sabor, aroma e textura típicas do produto, o chamado *terroir* (Furtado, 1980; Chaves et al., 2018).

O processo de fabricação do queijo do Serro dura, em média, três dias. No primeiro dia, ocorre a coagulação do leite recém ordenhado com adição do coalho comercial e do 'pingo'. Após a coagulação, são realizados o corte, a enformagem e a prensagem da massa, estas etapas são manuais. Subsequentemente, os queijos recebem a salga superficial a seco, o sal grosso é distribuído na superfície dos queijos, que permanecem nas formas, sobre as bancadas para drenagem do soro por dois ou três dias. No segundo dia, o queijo ainda enformado é virado, recebe mais uma salga e é transferido para outra bancada. São realizadas algumas viragens dos queijos ainda na forma e, a partir do segundo dia, inicia-se a coleta do 'pingo'. No terceiro dia, o queijo é desenformado, a superfície é ralada e lavada para remoção das imperfeições e uniformização da casca. Em seguida, o queijo é encaminhado para o "quarto dos queijos" onde ocorrerá a maturação, em prateleiras de madeira, em condições ambientais não controladas de temperatura e umidade relativa (Furtado, 1980; Chaves et al., 2018).

O local de produção do QMA é denominado de "casa do queijo", normalmente, é uma construção de alvenaria, fechada, com portas e janelas teladas, situada próximo ao local de ordenha das vacas. Após a ordenha, o leite é transferido para o processamento por meio de tubulação, é filtrado e entra diretamente no tanque ainda quente, devendo ser processado em até duas horas (Brant et al., 2007). Alguns requisitos são importantes para a fabricação de queijos artesanais de alta qualidade como o processamento rápido, a utilização

de leite de qualidade e bactérias láticas, a aplicação de técnicas apropriadas, as condições de maturação e o conhecimento do queijeiro (Murphy et al., 2016).

O QMA do Serro, normalmente, possui a casca esbranquiçada, tendendo a se transformar em uma crosta fina e amarelada após alguns dias de maturação. Internamente, a massa é branca, consistente e ligeiramente quebradiça, pode apresentar aberturas mecânicas pequenas, devido à enformagem e prensagem manuais e, não raramente, também possuem pequenas olhaduras provenientes da microbiota endógena, composta por bactérias propiônicas, naturalmente presentes no leite cru da região. O sabor do QMA do Serro é típico, salgado e mais ácido, quando comparado, ao queijo Minas industrial (Monteiro e Chaves, 2018). Possui teor de umidade entre 48 e 54%, teor de gordura no extrato seco de, no mínimo, 50%, tem formato cilíndrico com diâmetro variando de 13 a 15 cm, altura de 4 a 6 cm e massa de 0,4 a 1 kg (Emater, 2011).

Em geral, as propriedades produtoras de queijo do Serro são pequenas, possuem poucos recursos, sendo a produção dos queijos, uma atividade de subsistência sem incentivos financeiros, assim, dificilmente os produtores conseguem atender à exigência legal de maturar o queijo por, pelo menos, 17 dias em temperatura ambiente (IMA, 2013). Os QMA's são, majoritariamente, consumidos frescos, porém, alguns produtores têm optado pela maturação em razão da segurança e ao desenvolvimento de sabor diferenciado, o que permite agregar valor aos queijos e favorecer à comercialização (Martins, 2015). Para possibilitar a maturação, a Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro (COOPERSERRO) instalou uma câmara de maturação para queijos artesanais, com controle de temperatura e umidade (Vale et al., 2018).

Após 3 dias de dessoramento na propriedade rural, muitos produtores transportam os queijos para a cooperativa, onde, passam por um simples controle de qualidade, são lavados, secos por 24 horas, em câmaras frias, embalados a vácuo e armazenados em câmara fria a 7 °C, por 5 dias, para, então, serem enviados para expedição (Figueiredo et al., 2015). Andretta et al. (2019) analisaram a segurança microbiológica de QMA do Serro de diferentes produtores, obtidos no centro de distribuição da Associação dos Produtores, e mantidos sob refrigeração, os resultados encontrados foram negativos para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Mycobacterium tuberculosis* e *Brucella*

abortus, porém, as amostras apresentaram elevadas contagens de *Estafilococos* coagulase positiva, o que pode ser um problema devido à formação toxinas.

Os QMA's podem representar um potencial risco à saúde pública, pois são processados a partir de leite cru, sendo assim, podem vincular doenças transmitidas por microrganismos patogênicos presentes no leite oriundos da mastite e de outras doenças, como brucelose e tuberculose. A prevalência de *Brucella* spp., na região do Serro, foi detectada em 30,9% das amostras de QMA avaliadas, taxa considerada alta, representando um risco potencial à saúde pública (Duch, 2015). O leite também pode ser contaminado quando é obtido sem os devidos cuidados higiênico-sanitários durante a ordenha, ou ainda, nas diferentes etapas de pré-processamento e processamento (Chaves, 2011).

Outra característica do leite cru é que a sua composição pode sofrer alteração de acordo com a época do ano afetando, consequentemente, a qualidade dos queijos. Segundo Yasmin et al. (2012), a sazonalidade interfere na composição química e na microbiota do leite cru e, consequentemente, nas características dos queijos, podendo promover variações nas características sensoriais e nutritivas, impactando na aceitação e na credibilidade da cadeia produtiva, que deve construir e preservar um padrão de qualidade constante. Em estudo realizado por Figueiredo et al. (2015), foi verificada variação nas características do leite cru e do QMA do Serro produzidos em diferentes meses ao longo do ano. No leite cru, houve maior variação na acidez e no teor de lactose e nas contagens de coliformes termotolerantes e de bactérias lácticas. Nos queijos, ocorreu variação no pH, acidez, gordura corrigida para massa seca, massa seca, firmeza, adesividade, atividade de água, contagens de coliformes termotolerantes e de *Staphylococcus* spp. Importante destacar, deste estudo, que as maiores contagens de coliformes termotolerantes e de *Staphylococcus* spp. ocorreram no verão, que são os meses de maior índice pluviométrico e temperatura mais alta (Figueiredo et al., 2015).

6.3. Qualidade de QMA do Serro

Ao longos dos últimos anos, muitos estudos foram realizados com o QMA do Serro, alguns deles indicaram a existência de problemas em relação à segurança microbiológica destes queijos. Dentre as pesquisas realizadas, a de Brant et al. (2007), observou que o QMA do Serro pode representar um risco

quando apresentar contagens de *Estafilococcus coagulase* positiva acima de 10^6 UFC/g possibilitando a produção das enterotoxinas. Pinto (2004) observou uma contagem de *Staphylococcus* spp. acima de 10^6 UFC/g, porém, não foi detectada presença de enterotoxinas. Elevadas contagens iniciais de coliformes e de *S. aureus*, em queijos, indicam a falta de higiene no processamento. Pinto et al. (2009) inocularam *Listeria innocua* no queijo para avaliar a eficiência do 'pingo', que não foi capaz de reduzir a contagem desta bactéria, mesmo após 60 dias de maturação.

Cardoso et al. (2013) avaliaram a influência do tempo de maturação na segurança do queijo do Serro, observaram que inicialmente o produto apresentou elevada contaminação de coliformes (10^4 NMP/g), que foi reduzida após 30 dias de maturação. A contagem de *Estafilococcus coagulase* positiva também reduziu com o tempo de maturação, porém, em 1% das amostras foi detectada a presença da enterotoxina B e em 4%, da enterotoxina C. Pinto et al. (2011) estudaram o efeito de diferentes concentrações de nisina sobre *S. aureus* em QMA do Serro, durante 60 dias de maturação, observaram que a nisina reduziu a contagem de *S. aureus* a partir do 7º dia de maturação.

Algumas pesquisas têm comparado a maturação do QMA do Serro em diferentes condições, temperatura ambiente e sob refrigeração. Martins (2006) observou que, quando os QMA foram maturados em temperatura ambiente os queijos atingiram o padrão para ser considerado seguro, após 17 dias de maturação, tanto na época da seca, quanto na época das chuvas. Porém, quando os queijos foram maturados sob refrigeração foi necessário 33 dias, na época da seca, e 63 dias, na de chuvas, para atingir o padrão recomendado pela legislação vigente. Santos (2010) avaliou a qualidade microbiológica do QMA do Serro durante os 63 dias de maturação, em temperatura ambiente e sob refrigeração (8 °C), verificou que não houve efeito significativo das condições de maturação nos parâmetros microbiológicos do queijo. E, além disso, não foram encontradas *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras. Martins et al. (2015) avaliando o efeito da maturação em temperatura ambiente sobre os parâmetros microbiológicos do queijo, constataram redução na contagem de contaminantes, em 17 dias, o queijo atingiu os padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente.

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar características de qualidade do QMA do Serro, Figueiredo (2018) e Peres (2019) avaliaram queijos que foram maturados nas condições ambientais da propriedade de origem, no inverno e no verão, respectivamente, por diferentes tempos: 3, 8, 17, 38 e 60 dias. Figueiredo (2018) não observou variação significativa, em função do tempo de maturação, para pH, acidez, resíduo mineral fixo, profundidade de maturação e gordura corrigida para a massa seca. Neste estudo, os queijos com 3, 17 e 38 dias apresentaram contagens para coliformes a 35 °C e 45 °C acima do permitido pela legislação vigente, as contagens de *Staphylococcus* atingiram os limites a partir do 8º dia de maturação. Peres (2019) não observou variação significativa ao longo do tempo de maturação para resíduo mineral fixo, profundidade de maturação, gordura e gordura no extrato seco dos queijos e verificou efeito significativo no pH, acidez, umidade, atividade de água e proteína. Observou-se que todos os produtores apresentaram contagens de coliformes a 35 °C e 45 °C acima do permitido pela legislação vigente e as contagens de aeróbios mesófilos diminuíram ao longo do tempo de maturação.

6.4. Inovações na produção de Queijo Minas Artesanal do Serro

Para obter queijos diferenciados, alguns produtores tem inovado e optado por não realizar a lavagem da casca, promovendo assim, o desenvolvimento de fungos na superfície do queijo, tornando-a com a aparência rugosa. Carneiro et al. (2020) concluíram que a ausência da lavagem da casca do QMA do Serro influencia a hidrólise das proteínas, pois os metabólitos dos fungos podem penetrar no interior dos queijos e influenciar na proteólise.

A diversidade da microbiota responsável pelo *terroir* do QMA do Serro durante a maturação foi estudada por Aragão (2018), foram identificados que os fungos filamentosos predominantes são dos gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus*, *Acremonium* e espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides*. Quanto às leveduras, os gêneros prevalentes foram *Candida*, *Kodamaea*, *Torulaspora*, *Trichosporon* e *Kluyveromyces*. Neste mesmo estudo, verificou-se que a microbiota de fungos e leveduras foi influenciada pela estação do ano, os queijos do verão apresentaram maior diversidade de fungos filamentosos típicos do solo.

A identificação dos fungos e leveduras de QMA do Serro foi realizada por Souza (2019), foram encontradas leveduras que interferem de forma positiva nas características sensoriais do queijo, tais como, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*. Entre fungos filamentosos foram encontrados os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Geotrichum*, *Alternaria* e *Complexo Cladosporium cladosporioides*. No ambiente de maturação, encontrou-se a levedura *Trichosporon japonicum* e fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium* e *Complexo Cladosporium cladosporioides*.

Vale ressaltar que o típico QMA do Serro tem a casca lavada a cada 2 ou 3 dias, durante a maturação, não permitindo o crescimento de microrganismos na sua superfície. Leveduras, bolores e bactérias aeróbicas como *Corynebacteriaceae* e *Micrococcaceae* podem se desenvolver na superfície do queijo devido à maior disponibilidade de oxigênio (Montel et al., 2014).

Em estudo realizado por Carvalho et al. (2020), foi identificada a presença de ácaros da espécie *Tyrophagus putrescentiae* na casca de QMA do Serro. Os ácaros presentes no ambiente onde ocorre a maturação podem colonizar o queijo. A presença de ácaros na casca de queijos na maturação é uma prática permitida e centenária em alguns países europeus. Esses queijos têm característica bem aceitos pelos consumidores brasileiros, uma vez que, essa inovação gera novos sabores, além de agregar valor aos queijos artesanais (Carvalho et al., 2018a, 2018b).

Outra alteração que tem ocorrido na produção de QMA do Serro é a modificação do fermento. Alguns produtores estão fazendo a substituição do 'pingo' pela 'rala', como um inóculo alternativo. Antes do início da etapa de maturação dos queijos, ocorre a 'rala', nesta etapa, a superfície do queijo é ralada com auxílio de um ralador ou de uma pedra, para uniformização da casca, o material resultante é conhecido como 'rala'. A utilização da 'rala' como inóculo foi uma alternativa para reduzir a contaminação microbiológica (Vale et al., 2018). Porém, em estudo realizado por Andretta et al. (2019), não foi encontrada diferença significativa na contagem microbiológica de queijos produzidos com 'rala' ou 'pingo'. Brumano (2015) também avaliou a influência da 'rala' e do 'pingo', no QMA do Serro maturado por 60 dias e verificou que a utilização da

‘rala’ comprometeu a qualidade microbiológica. O queijo com ‘pingo’ precisou de 17 dias para atingir o padrão microbiológico exigido pela legislação, enquanto que o queijo com ‘rala’ necessitou de 27 dias. Também foram observadas diferenças nas características físico-químicas.

Conclusão

A partir dos dados apresentados nesta revisão, é possível observar que o QMA do Serro é um produto de relevante importância, não só para o estado de Minas Gerais, como também para o Brasil. Porém, ainda existem muitas lacunas que precisam ser preenchidas a respeito das características deste queijo. A maioria dos estudos realizados com este queijo avaliou as características microbiológicas, portanto, se fazem necessários estudos que envolvam as reações bioquímicas, como a proteólise, que ocorrem durante a maturação. Destaca-se, ainda, a ausência de estudos sobre as características sensoriais do QMA do Serro.

Os dados apresentados, nesta revisão, demonstram que diversos fatores influenciam as características sensoriais, físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas do QMA do Serro. Estudos sobre as transformações que ocorrem durante a maturação deste queijo são importantes e necessários.

Referências

Andretta, M.; Almeida, T.T.; Ferreira, L.R.; Carvalho, A.F.; Yamatogi, R.S.; Nero, L.A. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.12, p.10790-10798, 2019.

Bachmann, H.P.; Fröhlich-Wyder, M.T.; Jakob, E.; Roth, E.; Wechsler, D.; Beuvier, E.; Buchin, S. Cheese: Raw Milk Cheeses. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p.652-660, 2011.

Basanisi, M.G.; Nobili, G.; La Bella, G.; Russo, R.; Spano, G.; Normanno, G.; La Salandra, G. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**, v.135, p.17-19, 2016.

Beresford, T.P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N.L.; Cogan, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, n.4-7, p.259-274, 2001.

Brant, L.M.F.; Fonseca, L.M.; Silva, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 30** de 07 de agosto de 2013. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 12/08/2020.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 146** de 07 de março de 1996. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 12/08/2020.

Brasil. Presidência da República. **Lei Federal N° 13.680** de 14 de Junho de 2018. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/Lei/L13680.htm>. Acesso em: 01/09/2020.

Brasil. Presidência da República. **Lei Federal N° 13.860** de 18 de julho de 2019. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/Lei/L13860.htm#:~:text=LEI%20N%C2%BA%2013.860%2C%20DE%2018%20DE%20JULHO%20DE%202019&text=Disp%C3%B5e%20sobre%20a%20elabora%C3%A7%C3%A3o%20e,Art.>. Acesso em: 01/09/2020.

Brumano, E.C.C. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação do queijo Minas artesanal produzidos em propriedades cadastradas pelo IMA** (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro – MG. 2016. 136p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

Cardoso V.M.; Borelli B.M.; Lara C.A.; Soares M.A.; Pataro C.; Bodevan E.C.; Rosa C.A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v.69, p.331-340, 2015.

Cardoso, V.M.; Dias, R.S.; Soares, B.M.; Clementino, L.A.; Araújo, C.P.; Rosa, C.A. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal Microbiology**, v.44, n.3, p.743-749, 2013.

Carneiro, J.O.; Chaves, A.C.S.D.; Stephan, M.P.; Boari, C.A.; Koblitiz, M. Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening. **Heliyon**, v.6, n.7, e04446, 2020.

Carvalho, M.M; Fariña, L.O.; Strongin, D.; Ferreira, C.L.L.F.; Lindner, J.D.D. Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.11, p.9711-9720, 2019.

Carvalho, M.M., Alves Filho, E.G., Silva, L.M.A., Martins, F. I. C. C., Mاتيoli, A. L., Oliveira, E. E., Rodrigues, T. H. S., Fortes Ferreira, C. L. L., Machado da Silva, N., Zocolo, G. J., Lindner, J.D. Chemometric evaluation of the metabolites and volatile profiles of mite-ripened cheeses. **International Dairy Journal**, v.110, 2020.

Carvalho, M.M.; Oliveira, E.E.; Mاتيoli, A.L.; Ferreira, C.L.L.; Silva, N.M.; Lindner, J.D. Stored products mites in cheese ripening: Health aspects, technological and regulatory challenges in Brazil. **Journal of Stored Products Research**, v.76, p.116-121, 2018a.

Carvalho, M.M.; Silva, N.M.; Mاتيoli, A.L.; Oliveira, E.E.; Ferreira, C.L.L.; Lindner, J.D. Morphological and molecular characteristics of stored-product mites found on Brazilian ripened cheeses. **Journal of Stored Products Research**, v.79, p.79-82, 2018b.

Castro, R.D.; Oliveira, L.G.; Sant'Anna, F.M.; Luiz, L.M.P.; Sandes, S.H.C.; Silva, C.I.F., Silva, A.M.; Nunes, A.C., Penna, C.F.A.M.; Souza, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v.9, n.8, p.6086-6096.

Chaves, A.C.S.D. Leites. In: Maria Gabriela Koblitz. (Org.). **Matérias primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, v.1, p.147-186, 2011.

Climata-data, **Dados Climáticos para Cidades Mundiais**, 2020. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/>>. Acesso em: 15/09/2020.

Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v.13, n.11, p.841-866, 2003.

Costa Júnior, L.C.G.; Moreno, V.J.; Magalhaes, F.A.R.; Costa, R.G.B.; Resende, E.C.; Almeida, K.B.C. Maturação do queijo minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.69, p.111-120, 2014.

Dolci, P.; Alessandria, V.; Rantsiou, K.; Bertolino, M.; Cocolin, L. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. **International Journal Food Microbiology**, v.143, p.71-75, 2010.

Dores, M.T. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo minas artesanal da Canastra**. 2013. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Duch, A.A.S. **Estimativa da prevalência de *Brucella* spp em propriedades produtoras de queijo minas artesanal na microrregião do Serro em Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências e Tecnologia de Leites e Derivados), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2015.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Caracterização da região do Serro como produtora do queijo Minas artesanal**. Documento, Serro. Belo Horizonte, MG, 2020. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_HISTORICO/DOSSI%C3%8A%20DO%20SERRO%20def2.pdf>. Acesso em: 21/03/2020.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Queijo Minas Artesanal**. Guia técnico para a implantação de Boas Práticas de Fabricação em unidades de produção do Queijo Minas Artesanal, 2020. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_SITE/cartilha_queijo%202.pdf>. Acesso em: 21/03/2020.

Figueiredo, L.V. **Maturação e características de qualidade do queijo Minas Artesanal do Serro - MG**. 2018. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

Figueiredo, S.P.; Boari, C.A.; Costa Sobrinho, P.S.; Chaves, A.C.S.D; da Silva, R.B.; Silva Correio, H.B.F. Características do leite cru e do queijo Minas artesanal do Serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v.20, n.1, p.68-82, 2015.

Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology** - General Aspects. vol 1, 3rd ed, Elsevier Academic Press, California, USA, 617p, 2004a.

Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P. **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology** - Major Cheese Groups. vol 2, 3rd ed, Elsevier Academic Press, California, USA, 435p, 2004b.

Fox, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. v.1. General Aspects. Published by Chapman e Hall, 2-6 Boundary Row. 2nd. ed. 577p., 1993.

Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. Cheese: An Overview. In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, 3rd ed., Elsevier Academic Press, London, 2004.

Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**, Aspen Publishers, Gaithersburg, 1998.

Furtado, M.M. Queijo do Serro: Tradição na história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, n.210, p.33-36, 1980.

Giazzi, A.; Tosoni, N.F.; Moraes, M.L.; Furlaneto-Maia, L.; Katsuda, M.S. Propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas isoladas na região norte do Paraná. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.4, p.18861–18877, 2020.

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária. 2013. **Portaria N° 1305** de 30/04/2013. Estabelece as diretrizes para produção de queijo Minas Artesanal. Publicada no DOE em 01/05/2013.

INPI. 2011. **IG201001: Indicação Geográfica – Serro**, Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), Brasília, DF.

IPHAN. 2006. Parecer n° 006/2006: Processo N° 01450.012192/2006-65, referente ao Registro dos Queijos Artesanais de Minas, a ser inscrito no Livro dos Saberes. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minas_web.pdf>. Acesso em: 21/07/2020.

Johnson, M.E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p.9952-9965, 2017.

Lavasani, A.R.S.; Ehsani, M.; Mirdamadi, S.; Mousavi, S. Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 64-70, 2011.

Licitra, G. World wide traditional cheeses: Banned for business? **Dairy Science Technology**, v.90, p.357-374, 2010.

Licitra, G.; Caccamo, M.; Lortal, S. “Artisanal products made with raw milk”, Nero, L.A.; Carvalho, A.F. (Ed.). Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits. Academic Press, London, UK, p.175-221, 2019.

Martins, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro**. 158 p. 2006. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

Martins, J.M.; Galinari, E.; Pimentel-Filho, N.J.; Ribeiro Jr., J.I.; Furtado, M.M.; Ferreira, C.L.L.F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal Microbiology**, v.46, n.1, p.219-230, 2015.

McSweeney, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2/3, p.127-144, 2004.

Minas Gerais. **Lei N° 14.185** de 31 de janeiro de 2002. Processo de Produção do Queijo Minas artesanal. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/opencms/opencms/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=14185&comp=&ano=2002>>. Acesso em: 21/03/2020.

Minas Gerais. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) **Portaria 1.152** de 14 de julho de 2011. Inclui município na microrregião do Serro. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_download/955-portaria-no-1152-de-14-de-julho-de-2011+%cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br> Acesso em: 21/03/2020.

Minas Gerais. **Lei Nº 23.157** de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23157&comp=&ano=2018>>. Acesso em: 21/09/2020.

Monteiro, R.P.; Chaves, A.C.S.D. Tradição e Contradição: Queijo Minas Artesanal, Patrimônio Histórico, Legislação e Pesquisa, Monteiro, R.P.; Matta, V.M. (Ed.). **Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar**, Embrapa, Brasília, DF, p.15-34, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf>>. Acesso em: 30/07/2020.

Montel, M.C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D.A.; Desmasures, N.; Berthier, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v.177, p.13-154. 2014.

Murphy, S.C.; Martin, N.H.; Barbano, D.M.; Wiedmann, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of Dairy Science**, v.99, n.12, p.10128-10149, 2016.

Nóbrega, J.E. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais**. 115p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2012.

Nunes, K.S.; Mello, R.C. Um Estudo de Caso sobre a Indicação Geográfica como Estratégia para Comercialização do Queijo Minas Artesanal do Serro. Santa Luzia, **REAC 2**, v. 2, n.1, p.1-20, 2013.

Oliveira, S.P.P.; Martins, J.M; Nogueira, C.H; Vale, R.C.; Rodrigues, M.P.J.; Galleti, A.N. Características físico-químicas de queijo Minas artesanal do Serro fabricados com pinga e com rala. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.73, n.4, 235-244, 2019.

Peres, F.D. **Maturação e características de qualidade do Queijo Minas Artesanal do Serro - MG produzido em época de verão**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2019.

Perin, M.; Pereira, J.G.; Bersot, L.S.; Nero, L.A. The Microbiology of Raw Milk. Nero, L.A. and Carvalho, A.F. (Ed.). **Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits**. Academic Press, London, UK, p.45-64, 2019.

Pinto, M.S.; Carvalho, A.F.; Pires, A.C.S.; Paula, J.C.J.; Sobral, D.; Magalhães, F. A. R. Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**. v.20, n.12, p.1167-1170, 2009.

Pinto, M.S.; Martins J.M.; Ferreira, C.L.L.F. Queijo Minas artesanal da Região do Serro: Avaliação de *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.59, n.339, p.336-338, 2004.

Pinto, M.S.; de Carvalho, A.F.; Pires, A.C.D.S.; Souza, A.A.C., Silva, P.H.F.; Sobral, D.; de Paula, J.C.J.; Santos, A.L. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v.21, n.2, p.90–96, 2011.

Randazzo, C.L; Caggia, C.; Neviani, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Microbiol Methods**. v.78, n.1, p.1-9, 2009.

Sant'Anna, F.M.; Wetzels, S.U; Cicco, S.H.S; Figueiredo, R.C; Sales, G.A.; Figueiredo, N.C.; Nunes, C.A.; Schmitz-Esser, S.; Mann, E.; Wagner, M.; Souza, M.R. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, v.82, p.349-362, 2019.

Sihufe, G.A.; Zorrilla, S.E.; Perotti, M.C.; Wolf, I.V.; Zalazar, C.A.; Sabbag, M.G.; Costa, S.C.; Rubiolo, A.C. Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. **Food Chemistry**, v.119, p.101-107, 2010.

Silva, J.G.; Abreu, L.R.; Magalhães F.A.R.; Piccoli, R.H.; Ferreira, E.B. Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.66, n.380, p.16-22, 2011.

Sobral, D.; Costa, R.G.B.; De Paula, J.C.J.; Teodoro, V.A.M.; Moreira, G.D.M.M.; Pinto, M.S. Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão, **Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.72, n.2, p.108-120, 2017.

Souza, T.P. Micobiota *terroir* em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro: segurança e qualidade. **Dissertação** (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2019.

Tonietto, J. Afinal o que é *terroir*? **Bom vivant, Flores da cunha**. v. 8, n.98, p. 08, 2007.

Yasmin, A.; Huma, N.; Butt, M. S.; Zahoor, T.; Yasin, M; Seasonal variation in milk vitamin contents available for processing in Punjab, Pakistan. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.11, n.2, p.99-105, 2012.

Capítulo 2

Optimization of the Electrophoresis Tricine-SDS-PAGE for Simultaneous Detection of Protein and Peptide in Artisanal Cheese

Juliana de Oliveira Carneiro¹, Marilia Penteado Stephan², Izabela Miranda de Castro², Ana Carolina Sampaio Doria Chaves², Alexsandro Araújo dos Santos², Tatiana de Lima Azevedo² and Maria Gabriela Bello Koblitz¹

¹ Laboratory of Biochemistry, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Cep 22290-240, Brazil.

² Laboratory of Biochemistry, Embrapa Food Technology, Rio de Janeiro, Cep 22210-085, Brazil.

*published in the Journal of Agricultural Science and Technology B.

Abstract

The objective of this paper was to optimize an electrophoretic methodology (Tricine-SDS-PAGE) to monitor the degree of caseins hydrolysis during the maturation time of artisanal cheese. A cheaper and easier method was obtained using small samples and micro-quantities of reagents. Simultaneous detection of proteins and peptides (100 kDa to 1 kDa) in the same gel was another advantage of the method. Initially, protein extraction was performed with 2 mg of lyophilized cheese dissolved in 1.0 mL of sample electrophoretic buffer for 1 h under stirring. After that, the Eppendorf tubes of the samples were kept at -4 °C for 4 h with additional centrifugation at 5,433 $\times g$ for 2 min. This defatting process using centrifugation/refrigeration promoted a good separation of proteins and peptides from the fat layer. After this step, 30 μ L of the supernatant of the protein extracts was applied to the electrophoresis gel. The results revealed a clear image of protein and peptides in the polyacrylamide gels and allowed an excellent response of the distribution of casein bands (α , β and κ) and the exposure peptide in cheese. The utilization of artisanal cheese as a pilot study of molecular protein analysis could be helpful for further correlation of the fingerprint of protein-peptide profile with taste quality

Key words: Artisanal cheese, electrophoresis, maturation time, proteolysis.

1. Introduction

The stage of cheese maturation involves many physical, chemical and biochemical reactions. The time can vary from a few days to more than two years

depending on the type of cheese. Proteolysis is the most complex and important primary event that occurs during cheese ripening and it plays a vital role in the development of texture and flavor. Hydrolysis of caseins leads to the formation of large and intermediate-sized peptides, which are degraded into smaller peptides by enzymes produced by starter culture and non-starter bacteria or fungi [1]. This will result in peptides of differentiated molecular mass as already described by studying artisanal cheeses using proteomic analysis [2]. It is important to emphasize that others authors [2] used a very expensive proteomic and peptidomic methodology of analysis as well as the laborious procedure of protein extraction. Many studies show the application of capillary electrophoresis, liquid chromatography coupled with Tandem mass-spectrometry (MS/MS), and ultra-performance liquid chromatography to study proteolysis in cheese [3]. It is very important to say that electrophoresis in gel of polyacrylamide is a simple technique that can be also used to study proteolysis of cheese. Three kinds of electrophoresis could be applied for this study, SDS-PAGE [4], Native PAGE [5] and Tricine-SDS-PAGE [6]. However, using only the procedure with Tricine-SDS-PAGE [6], it was possible to identify peptides with molecular weight up to 1 kDa. The objective of this work was to show the application of Tricine-SDS-PAGE electrophoresis technique with the modification of procedure method of sample preparation, which uses micro-quantities of samples and buffer. The simplicity of the defat step and protein extraction is also a new strategy.

2. Materials and Methods

The cheese samples were purchased from three different producers of the state of Minas Gerais in Brazil. Electrophoresis Tricine-SDS-PAGE [5] was utilized for identification of protein-peptide profiles of cheese matured during two different times (17 d and 60 d). After freeze-drying, 2 mg of crushed cheeses was solubilized during 1 h under agitation with electrophoretic buffer pH 6.8 with 4% SDS, 12% glycerol, 2% mercaptoetanol and 0.01% Coomassie blue G250, using Eppendorf tube. Two different extracts of protein and peptide extracts were obtained: with and without fat. The one with fat was applied directly in the electrophoresis. In order to obtain the protein-peptide extract without fat, the fatted extract was kept under -18 °C during 4 h and further centrifuged 5,433×g

during 1 min. The purified protein-peptide extract has been removed from the upper layer of fat with a micropipette.

3. Results and Discussion

All samples with fat, obtained from three different cheese producers at two different times of maturation (17 d and 60 d), showed a gel with a spread staining (Fig. 1). This could be explained by the high amount of fat present in these cheese protein extracts. As a solution to solve this problem, additional steps in the methodology were included. Initially, the same procedure of obtaining the protein extract was utilized as following, 2 mg of crushed and freeze-dried cheese was solubilized in electrophoretic buffer and submitted to vigorous agitation during 1 h at room temperature. The introduction of two steps in this procedure gave as a result a polyacrylamide gel showing a completely clear image, first by submitting them to 1 h incubation at -4 °C, in the same Eppendorf tubes of 2.0 mL and with further centrifugation at 5,433 $\times g$, during 1 min. The clear protein extract separated from small fat plates can be seen in the Eppendorf tubes for all cheeses of the three producers (Fig. 2). Recently, molecular studies involving cheese analysis have shown the use of laborious steps for sample purification as described for the analysis of a peptide (3.5 kDa) by LC-MS/MS [7], while other works show the formation of peptides arising from cheese ripening by electrophoresis Urea-PAGE [8] or SDS-PAGE [9]. The association of Tricine-SDS-PAGE and the samples without fat shows the quality of this result and that the method has been optimized. The defatted extracts were applied in polyacrylamide gel electrophoresis Tricine-SDS-PAGE (concentrations of acrylamide of 16.5%, 10% and 4% were used, respectively, in the separating gel, spacing gel and application gel) and a gel with a clear aspect was obtained (Fig. 3). The results related to the cheese ripening process show different protein and peptide profiles among the three producers, probably due to the specific ripening conditions of each one. Genomic analysis, nuclear magnetic resonance (NMR) and immunochemical analysis are currently being used for proteolysis studies in cheese. These results refer to the genomic analysis, monitoring of transcriptional mechanism activity of genes [10], proton transverse of water/oil relaxation [11, 12] and immunochemical quantification of milk proteins [9], respectively. The disadvantage of the above-mentioned methods is related to the need for a large

financial investment in equipment acquisition [7, 10-12] when compared to the Tricine-SDS-PAGE electrophoresis method. Another scientific group working with soybean proteins has also used Tricine-SDS-PAGE method, however a complicate and long time for pure extracted was utilized [13]. Moreover, the electrophoretic analysis utilized in this paper has three advantages: (a) detection of protein breakdown and peptide formation in the same gel; (b) simple and alternative method of defatting; (c) micro-quantities utilization of reagent and sample. The excellent result obtained can be observed in Fig. 3. A total integrity of the three caseins (α , β and κ) and no appearance of peptides were observed in the peptide/protein extracts. The lack of casein hydrolysis can be observed by the high staining in the two different days of maturation (17 d and 30 d) of the cheese obtained from producer 2 (Fig. 3). In the cheese produced by producers 1 and 3 it was observed a reduction of staining of casein only after 60 d of maturation for producer 1 and for 17 d and 60 d for producer 3 (Fig. 3).

Concerning peptide production, cheese of producer 1 has shown 11 kDa peptide (17 d) and 9 kDa peptide (60 d), in Fig. 3. The fingerprint variations among the producers show the need for standardization of the maturation process. Concerning the field of cheese production, it can be suggested that gel electrophoresis can serve as a database of images that together with process data will guarantee the quality of the cheeses. Regarding the methodological aspects, the utilization of micro-quantities of reagents and the simple procedure for fat removal are advantages concerning economic aspects and environmental preservation. Finally, this pilot study with artisanal cheese shows that utilization of this method could be applied in the future to characterize the quality of all sorts of cheeses. The most important advantage of this work is the simplicity of the method of sample preparation together with the utilization of micro-quantities amounts of samples and reagents, when compared with other methodologies, chromatographic, electrophoretic, genomic and immunochemical [7-10].

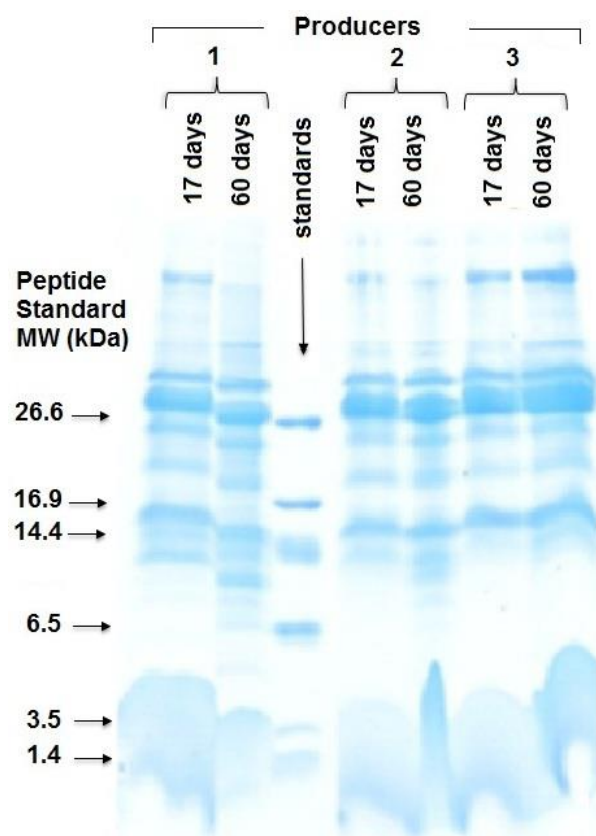


Fig. 1 Tricine-SDS-PAGE electrophoretic profiles of fatty protein-peptide extracts obtained from artisanal cheeses of three different producers.

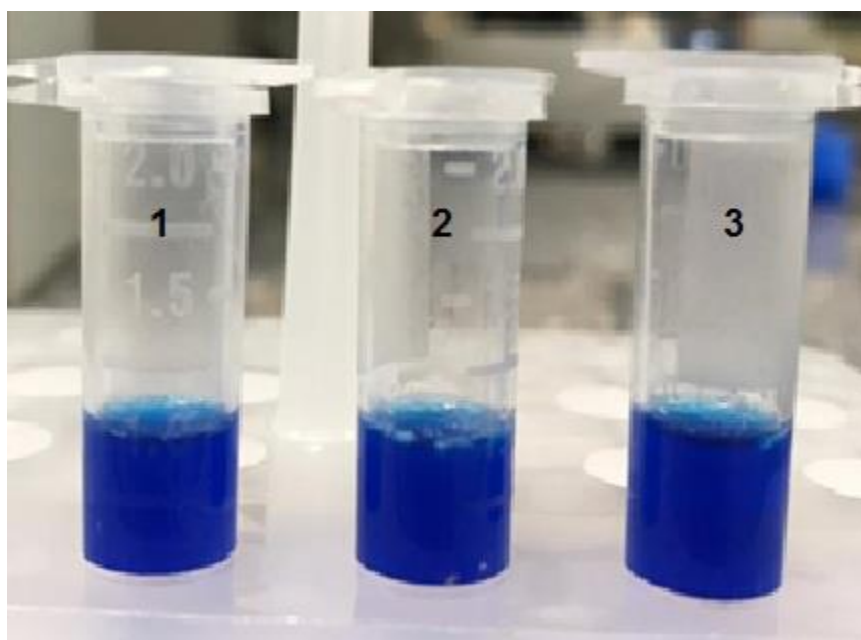


Fig. 2 Eppendorf tubes with the separation of fat layer from the protein-peptide extract of cheese from three different producers.

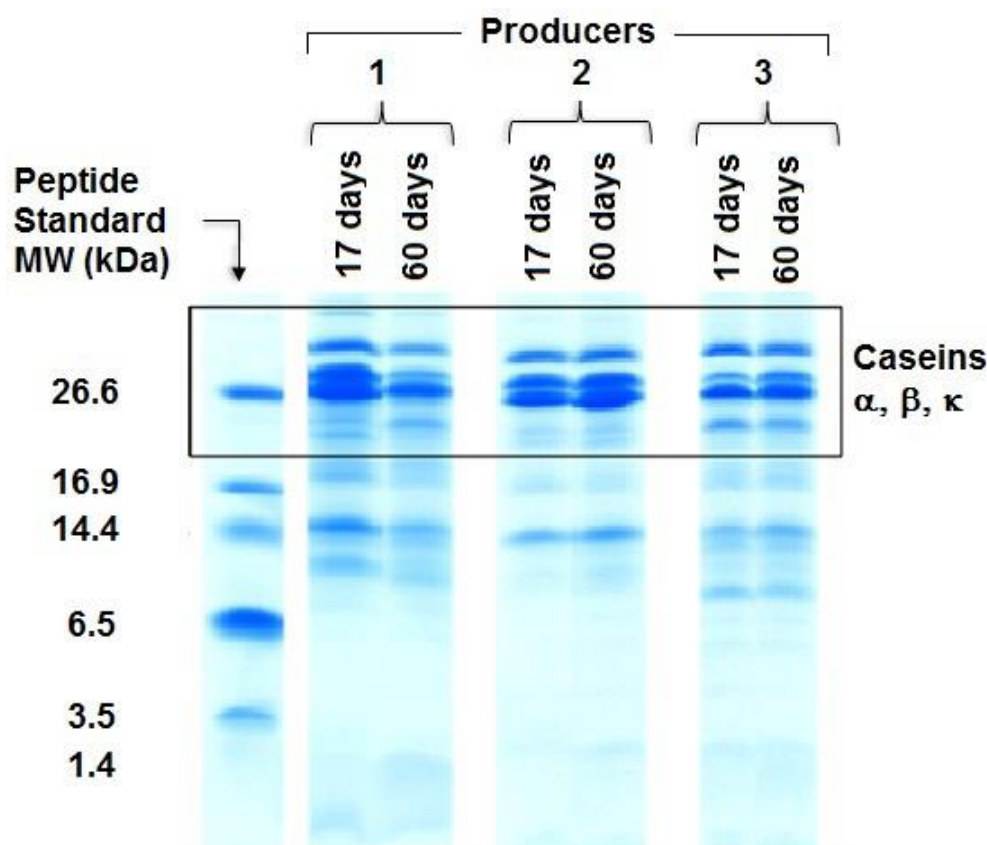


Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE electrophoretic profiles of defatted protein-peptide extracts obtained from artisanal cheeses of three different producers (1, 2 and 3).

4. Conclusions

This paper shows a contribution in the adjustment of a methodology of low cost for simultaneous analysis of protein and peptides using electrophoretic Tricine-SDS-PAGE as analytical tool. This contribution is related to low quantities of reagents and samples utilized for protein and peptide extraction and by the fast and simple procedure of defatting. This methodology may be useful for standardization and guarantee the quality of the cheese either by visualization of the diminishing of caseins content or by the appearance of new peptide, as a consequence of hydrolysis.

References

- [1] Fox, P. F., Mcsweeney, P. L. H., Cogan, T. M., and Guinee, T. P. 2004. "Cheese: An Overview." In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3th ed. London: Elsevier Academic Press.

- [2] Silva, R. A., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C., Porto, A. L., and Cavalcanti, M. T. 2016. "Proteomic and Peptidomic Profiling of Brazilian Artisanal 'Coalho' Cheese." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 4297-632.
- [3] Taivosalo, A., Krisciunaite, T., Seiman, A., Part, N., Stulova, I., and Vilu, R. 2018. "Comprehensive Analysis of Proteolysis during 8 Months of Ripening of High-Cooked Old Saare Cheese." *Journal of Dairy Science* 101: 944-67.
- [4] Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-5.
- [5] Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., and Bachmann, M. 2012. "Native Polyacrylamide Gels." *Methods Molecular Biology* 869: 49-53.
- [6] Schägger, H., and Jagow, G. V. 1987. "Tricine-Sodium Dodecyl-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa." *Analytical Biochemistry* 166: 368-79.
- [7] Lim, C. W., Lai, K. Y., Ho, W. T., and Chan, S. H. C. 2019. "Isotopic Dilution Assay Development of Nisin A in Cream Cheese, Mascarpone, Processed Cheese and Ripened Cheese by LC-MS/MS Method." *Food Chemistry* 292: 58-65.
- [8] Vélez, M. A., Hynes, E. R., Rodriguez, G., Garitta, L., Wolf, I. V., and Perotti, M. C. 2019. "A New Technological Approach for Ripening Acceleration in Cooked Cheeses: Homogenization, Cooking and Washing of the Curd." *WLT-Food Science and Technology* 112: 108-241.
- [9] Ivens, K, Baumert, J. L., Hutkins, R. L., and Taylor, S. L. 2016. "Effect of Proteolysis during Cheddar Cheese Aging on the Detection of Milk Protein Residues by ELISA." *Journal of Dairy Science* 100: 1629-39.
- [10] Pangallo, D., Kraková, L., Puskárová, A., Soltys, K., Bucková, M., Korenová, J., Budis, J., and Kuchta, T. 2019. "Transcription Activity of Lactic Acid Proteolysis-Related Genes during Cheese Maturation." *Food Microbiology* 82: 416-25.
- [11] Chen, Y., Macnaughtan, W., Jones, P., Yang, Q., and Foster, T. 2020. "The State of Water and Fat during the Maturation of Cheddar Cheese." *Food Chemistry* 303: 125390.
- [12] Everett, D. W., and Auty, M. A. E. 2017. "Cheese Microstructure." In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 4th ed., edited by Mc Sweeney, P. L., Fox, P. D., Cotter, D. W. London: Academica Press, 549.
- [13] Ying, Y., Zhao, L., Kong, L., Kong, X., Hua, Y., and Chen, Y. 2015. "Solubilization of Proteins in Extracted Oil Bodies by SDS: A Simple and Efficient Protein Sample Preparation Method for Tricine-SDS-PAGE." *Food Chemistry* 181: 179-85.

Capítulo 3

Artisan Minas Cheese of Serro: Proteolysis during ripening

Juliana de Oliveira Carneiro¹; Ana Carolina Sampaio Doria Chaves²; Marília Penteado Stephan²; Cleube Andrade Boari³; Maria Gabriela Bello Koblitz^{1*}

¹ Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN) – Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO)

² Embrapa Food Technology – Brazilian Agricultural Research Corporation

³ Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri (UFVJM), Faculty of Agricultural Sciences - Department of Zootechnics, Campus JK

*Corresponding author: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro -
- Laboratório de Biotecnologia. Av. Pasteur, 296 – Escola de Nutrição, 2º andar.
Urca, Rio de Janeiro - RJ. Brasil. 22290-240.

*Received 18 March 2020; Received in revised form 20 May 2020; Accepted 9 July

Abstract

The Artisan Minas Cheese (AMC) is the oldest and most traditional Brazilian cheese, it is produced in several regions of the state of Minas Gerais, such as the Serro region. The most striking features of the AMC-Serro are the use of raw milk and natural bacteria from the whey, popularly known as *pingo*, as well as the use of the rind washing process. The aim of the present study was to evaluate the proteolysis of the AMC-Serro from three different producers, during 60 days of maturation, and to relate the proteolysis to the producing farms, the production season and the rind washing during ripening. For this purpose, TRICINE-SDS-PAGE, proteolysis extension and depth indices, moisture, and texture (firmness) were evaluated. It was concluded that the temperature and moisture of the cheeses, which was determined by the location of the ripening room, the production season and the rind washing, were the most important factors. The degree of proteolysis also had an impact on the water loss during ripening, with effect on cheese safety. The results obtained in this study may be used to better understand the transformations during ripening of AMC-Serro and help the small traditional farmers to improve their product's quality and stability.

Key words: electrophoresis, proteolysis extension index, proteolysis depth index, firmness; moisture.

INTRODUCTION

Artisanal cheeses show unique characteristics, which vary according to the region and the milk microbiota where they are produced and contribute to their inherent social and cultural value (Santilli, 2015). The Artisan Minas Cheese (AMC) is the oldest and most traditional Brazilian cheese and is produced in several regions of the state of Minas Gerais. Among them is the Serro region, that encompasses a large area (2,258km²) including small villages with 3,600 inhabitants and larger towns with up to 18,000 residents. The cheesemaking culture in the Serro region is traditional for Brazilian standards, with almost 300 years of history, and the know-how for the local artisanal cheese production has been passed down from generation to generation over the years (Monteiro, 2018).

The most important features of the AMC-Serro are the use of raw milk and of natural starter cultures of the whey from the previous cheese production, popularly known as *pingo* – which loosely translates as “drop” (Perin et al., 2017). The *pingo* contains a high concentration of sodium chloride and many endogenous lactic acid bacteria, responsible for the typical sensory characteristics of the cheese of each producer (Bachmann et al., 2011). Other peculiarities are the short maturation period of at least 17 days and the use of the rind washing process, which consists of rinsing the surface of the cheeses with water and that occurs every two or three days, depending on the environmental conditions of temperature and humidity of the maturation room (Chaves et al., 2018). However, some producers are innovating and eliminating the washing step, which allows fungi to grow on the rind. The AMC-Serro is recognized by the Institute of National Historical and Artistic Heritage (IPHAN - “Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional”) as an intangible heritage in Brazil, and was the first Brazilian cheese to receive the Geographical Indication from the National Institute of Intellectual Property (INPI - “Instituto Nacional de Propriedade Intelectual”) in 2011 (IPHAN, 2008; Monteiro, 2018), nevertheless, there are only a few studies published concerning its production and quality to date.

Over the course of ripening, cheeses lose water and undergo a series of changes that result in sensory, chemical and biochemical modifications, transforming the final product (McSweeney, 2004; Salum et al., 2018). The

intensity of proteolysis is highly variable and depends, among other factors, on the enzymes in the rennet, the composition of the endogenous milk microbiota and the added microorganisms, the endogenous proteases in the raw milk and on those produced by the different microorganisms present (Cavalcante et al., 2007; Fox et al., 2015). To monitor the cheese ripening process, it is useful to chemically determine the extension and depth of proteolysis, that help to quantify and characterize the contribution of the many agents acting on the cheese proteolysis during ripening (McSweeney, 2004). Although the study of proteolysis is of great importance to understand the cheese maturation process, little information is available on the proteolysis of the AMC in general and of the AMC-Serro in particular (Costa Junior et al., 2009; Pinto et al., 2011; Silva et al., 2011 and Sobral et al., 2015). Due to the absence of data on proteolysis of Brazilian artisanal cheeses, the present study aimed to evaluate the proteolysis of the AMC-Serro during 60 days of ripening, and to relate these data to the producing farms, the season of production and the application of the rind washing process during ripening.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

For this study, samples of cheese were collected from three different farms/producers (P1, P2 and P3). In each producing farm, ripening occurred in a ripening room with a particular micro-climate (temperature and relative humidity) determined by its location. The ripening room in P1 was in an area with little exposure to direct sun, with an average temperature of 18,2 °C and 68% relative humidity in winter, and 21 °C and 78% in summer. The ripening room in P2 was in the shade, under the canopy of a tree, with an average temperature of 17 °C and 72% relative humidity in winter, 20 °C and 81% in summer. And in P3 ripening room was exposed, with direct incidence of the afternoon sun with an average temperature of 18.5 °C and relative humidity of 67% in winter and 22.5 °C and 78% in summer. The temperature and relative humidity data were recorded using a thermo-hygrometer (Instrutherm Mod. HT-70, São Paulo, BR according to the manufacturer's instructions). The measuring instrument was placed on a shelf of cheese, in the maturation room at a height of 1.8 m). The maturation rooms, with

an area of approximately 20 m², were made of brick, lined with ceramic and contained wooden shelves on which the cheeses were ripening.

All cheeses were produced with raw milk, following the traditional processing techniques of the Serro region: the *pingo* (the salted whey collected on the second day after coagulation) was used as inoculum, and industrial rennet (Ha-La®, Chr. Hansen, microbial chymosin, *Aspergillus niger* var. *awamori*) was added to the milk. P1 and P2 did not apply the periodic rind washing process on the surface of the cheeses but cheeses from P3 were rinsed every two or three days along the ripening period.

The cheeses were matured in the original farms and had approximately 1 kg, the samples were collected after 3, 17 and 60 days of ripening (3D, 17D and 60D). The AMC-Serro samples were collected in two seasons, during the winter of 2017 and during the summer of 2018. All the results showed in this study represent the mean of three batches of cheese processing in each farm.

The samples were frozen at -18 °C to interrupt the ripening process and transported to the Embrapa Food Agroindustry facility, in Rio de Janeiro, where the samples were prepared and analyzed.

Preparation of extracts

The cheese samples were ground in a domestic food-processor (Mixer Philips Walita Viva Collection, Barueri, BR) for two minutes and then frozen and freeze-dried for 24 h (LioTop, model L101, São Carlos, BR). The extracts preparation and the TRICINE-SDS-PAGE procedure followed the methodology described by Carneiro et al. (2019).

TRICINE-SDS-PAGE

The analyses of caseins and possible products generated by proteolysis during ripening were performed in a modified TRICINE-SDS-PAGE system using the gel preparation technique according to Schägger and Jagow (1987). The gel run was performed on a Biorad® brand Powerpack Basic (Hercules, USA) equipment. Three different acrylamide gels were used at the following concentrations: 16.5% for the separation gel; 10% for spacing gel and 4% for sample application gel. Thirty microliters of the previously degreased samples were applied, the run was started under 15 V for 15 h and continued for 6 h in an 85 mA current.

A Bio-Rad® peptide standard containing the following proteins was used: 26,625 kDa triose phosphate isomerase; myoglobin, 16,950 kDa; α-lactalbumin, 14,437 kDa; aprotinin, 6,512 kDa; β-oxidized insulin, 3,496 kDa and bacitracin, 1,423 kDa.

After the end of the run, the gel was placed in a fixative solution with 50% methanol and 10% acetic acid under stirring for one hour. Subsequently, the gel was washed in distilled water and immersed in a dye solution containing 0.025% Coomassie G250 blue in 10% acetic acid for 2 h. For bleaching the gel, a 10% acetic acid bleach solution was used, the gel was immersed under stirring for 2 h and the solution was changed every 30 min. At the end of this step, the gel was washed in distilled water and then scanned (Image Scanner III model GE Scanner®) for image record.

Proteolysis extension and depth indices

To assess the extent of proteolysis, the total nitrogen (TN), the water soluble nitrogen at pH 4.6 (WSN), the non-protein nitrogen (NPN), and soluble nitrogen in 12% (v/v) trichloroacetic acid (TCASN) were determined by the Kjeldahl method (according to the IDF methodology, 1993). The total protein (TP) content was determined indirectly by multiplying the percentage of TN by the factor of 6.38, indicated for protein derived from milk (IDF, 1993). The ripening extension index (Equation 1) and the ripening depth index (Equation 2) were determined according to Pereira et al., 2008 and Pereira et al., 2010).

$$\text{Ripening extension index (\%)} = \frac{(\text{WSN at pH 4.6} \times 100)}{\text{TN}} \quad [1]$$

where WSN means water soluble nitrogen and TN means total nitrogen.

$$\text{Ripening depth index (\%)} = \frac{(\text{TCASN} \times 100)}{\text{TN}} \quad [2]$$

where TCASN means trichloroacetic acid-soluble nitrogen and TN means total nitrogen.

Moisture and firmness

Moisture was determined in triplicate following the method recommended by AOAC International 930.15 (2010).

The firmness of the cheese samples was determined using cylindrical samples with 20 mm diameter and 20 mm height, taken from the central region of each sampled cheese. The measurements were performed using a texturometer (TA.XT2 Plus® Stable Micro Systems Texturometer Stable Micro Systems®, Haslemere, UK) equipped with a wire probe. The results were obtained and analyzed using Exponent Lite version 5.1® software (Stable Micro Systems). The equipment was calibrated with a standard weight of 5 kg. In the pre-test, the device's descent and the shear rate were 200 mm/min and in the test and in the posttest the speed was 2 mm/s and the samples penetration distance was 15 mm (Marinho et al., 2015). Analyzes were performed in triplicate.

Statistical analysis

The statistical analysis of the data was performed using the GraphPad Prism (5.0) software (GraphPad Software® Inc. San Diego, CA, USA) applying 2-way ANOVA with the Bonferroni posttest and $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

TRICINE-SDS-PAGE

The SDS-PAGE results obtained presented well-defined and clear casein bands, with different hydrolysis levels throughout the ripening period, evidencing the influence of several factors. The removal of fat from the extract provided adequate runs, resulting in gels without spots, with well-marked bands, allowing their identification. Figure 1 shows the electrophoresis gel of the cheese samples after 3, 17 and 60 days of ripening, in winter and summer, for P1, P2 and P3.

Figures 1A and 1B show the results for samples obtained from P1. Well-marked bands were observed at the beginning of the ripening, showing the preservation of the casein fractions (α and β). From the 17th day of ripening, there was a decrease in the intensity of these bands and the appearance of more pronounced bands of lower molecular weight, evidencing the occurrence of proteolysis. After 60 days of ripening, the bands of smaller molecular weight became even more

intense. Comparing both gels (A and B) in Figure 1, the samples showed similar behavior during the winter and the summer.

In Figures 1C and 1D the gel images show the samples obtained from P2. The presence of well-marked bands of the different casein fractions can be observed. No noteworthy change was observed until the 17th day of ripening, indicating that truly little proteolysis occurred during both seasons summer and winter. After 60 days, the intact casein bands presented lower intensity and there was the appearance of lower molecular weight bands, showing the occurrence of proteolysis, which was much more intense in summer (1D) than in winter (1C). This may be observed by the high decrease of intensity of the caseins bands and by the higher number and intensity of lower weight bands after 60 days, in Figure 1D (summer) but not in Figure 1C (winter). It is noteworthy that a very efficient hydrolysis could lead to the formation of peptides with molecular weight below the detection limit of the method used, which was of one kDa.

In Figures 1E and 1F are the gels from P3 and no visible proteolysis during the maturation time may be observed, especially in the winter (1E). The ripening during winter (Figure 1E) showed almost no casein hydrolysis, as the proteolytic profile of the samples remained remarkably similar during the 60 days studied. Only in summer, there was some proteolysis, the bands of the casein fractions became less intense and bands of smaller molecular weight appeared. These samples behaved very differently from those obtained from P1 and P2.

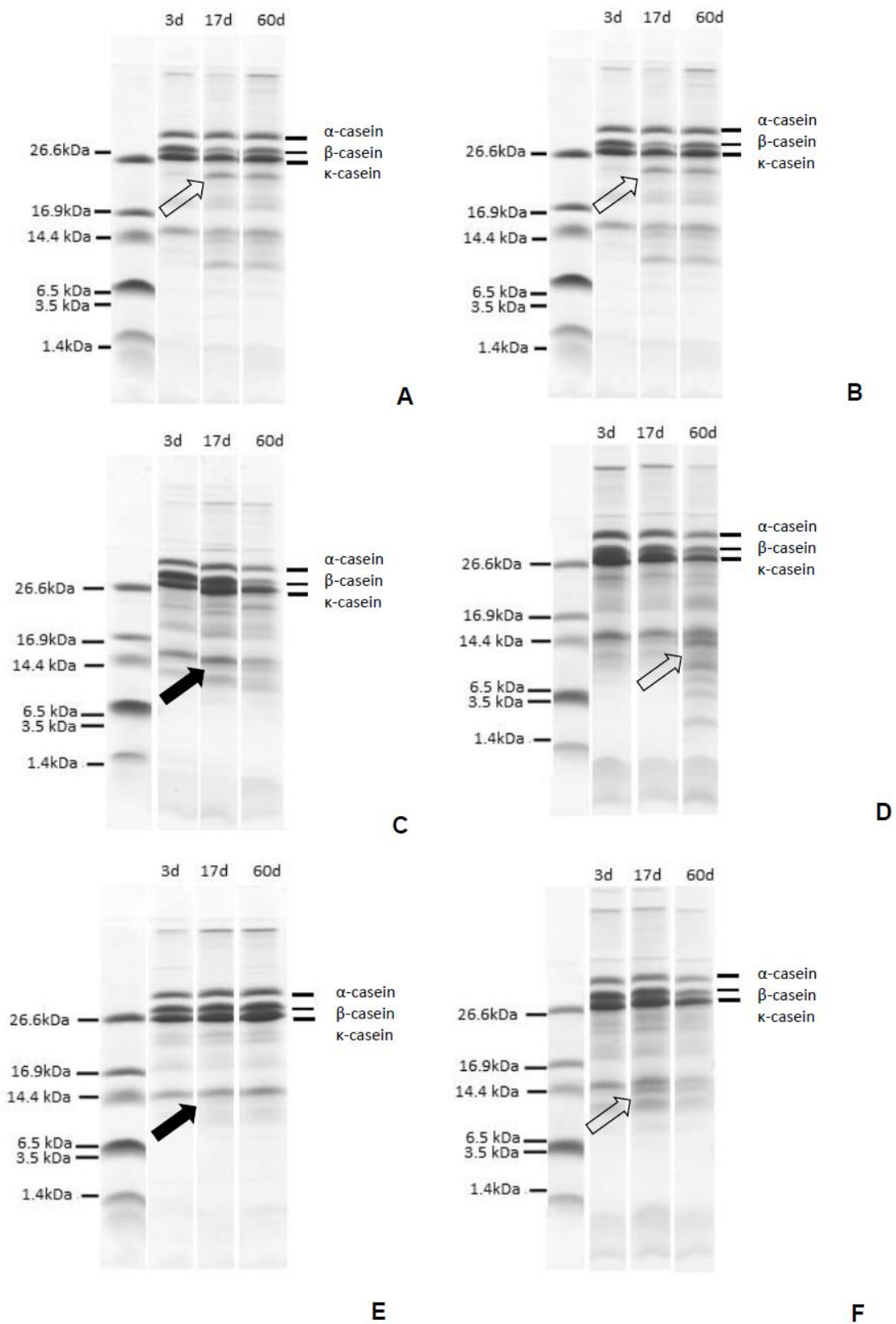


Figure 1. Electrophoresis gels: (A) P1 Winter 2017; (B) P1 Summer 2018; (C) P2 Winter 2017; (D) P2 Summer 2018; (E) P3 Winter 2017; (F) P3 Summer 2018. Hollow arrows indicate where proteolysis occurred, and full arrows indicate where proteolysis did not occur. For original non-adjusted gels see Supplementary Figures 1 - 4.

Proteolysis and ripening extension and depth indices

The results obtained for the ripening extension and depth indices of proteolysis were presented in Figure 2A and 2B, respectively. Producer and season seemed to be the most important variables for both indices, whereas time seems to show influence only regarding the season. The cheese samples from P1 and P3 showed similar behavior: no significant alteration in the ripening indices during the winter and significant increase in both, extension and depth indices, during the summer. The samples from P2 behaved differently, with a slight but significant increase in ripening extension index during the winter, but no other significant alterations. The highest values of ripening extension and depth indices were found for the samples from P1, after 60 days of ripening, in summer. Regardless of the initial behavior, in the summer, the samples from P2 and P3 did not show significant difference at the end of the maturation time. On the other hand, in winter, the cheeses from P1 and P2 showed similar results after 60 days, that were significantly different from the lower values achieved by the cheeses from P3.

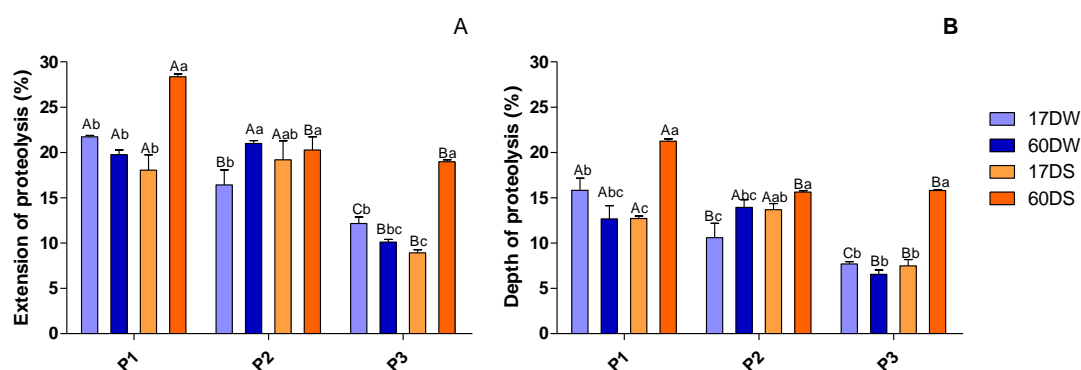


Figure 2. Ripening Extension (A) and Depth (B) indices (%) during winter (W) and summer (S). Different uppercase letters indicate a significant difference between the different producers (P1, P2, P3) at the same time of analysis. Different lower-case letters indicate significant difference over time and seasons for the same producer.

Moisture and firmness

The data for moisture content and instrumental firmness were shown in Figures 3A and 3B, respectively. All samples showed a significant moisture decrease over time, except for the cheeses from P3, that showed no significant reduction in

moisture content throughout the ripening period, during the summer. The cheeses from P3 showed the highest moisture loss, after 60 days, in winter (there was a 50% reduction) and the lowest in the summer (34%), whereas cheeses from P1 and P2, both in winter and summer, presented the same decrease in moisture content of around 40%. The moisture content of the samples from all the producers were significantly higher in winter than in summer, and there was no difference between the moisture of the different producers in the latter season, while samples from P3 showed the lowest moisture content during winter.

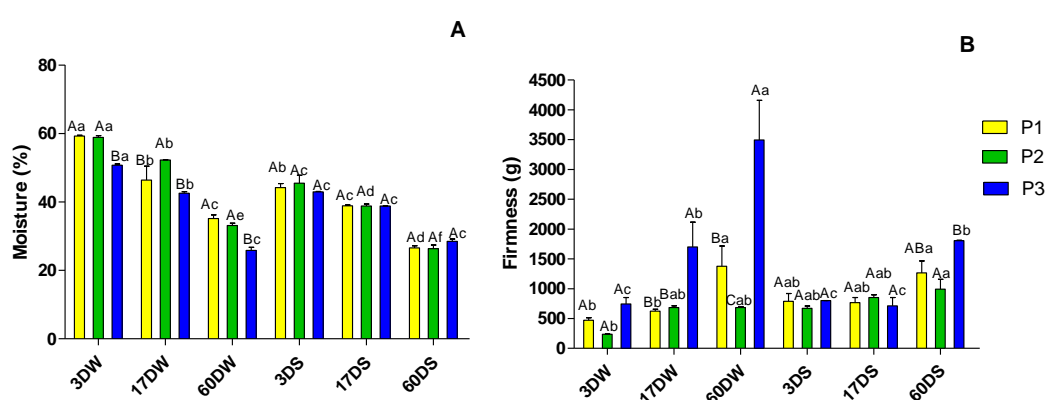


Figure 3. Moisture (A) and instrumental firmness (B) during Winter (W) and Summer (S). Different uppercase letters indicate a significant difference between the different producers (P1, P2, P3) at the same time of analysis. Different lower-case letters indicate significant difference over time and seasons for the same producer.

The firmness observed for the samples from P1 and P3 increased significantly during ripening, in both seasons, but the samples from P2 showed no significant difference in firmness during maturation, regardless of the season. The highest increase in firmness were recorded for the cheeses from P3 during winter (370%) and during summer (126%).

The relationship between moisture content and instrumental firmness was evaluated through the Pearson correlation and the results were presented in Figure 4 (A-F). All analyzed data showed a negative correlation, the higher the moisture content, the lower the firmness, with high correlation coefficients (r) and also high coefficients of determination (r^2), except the data from P1 during winter,

although only the data from P3 during winter were significant, with 95% confidence ($p < 0.05$).

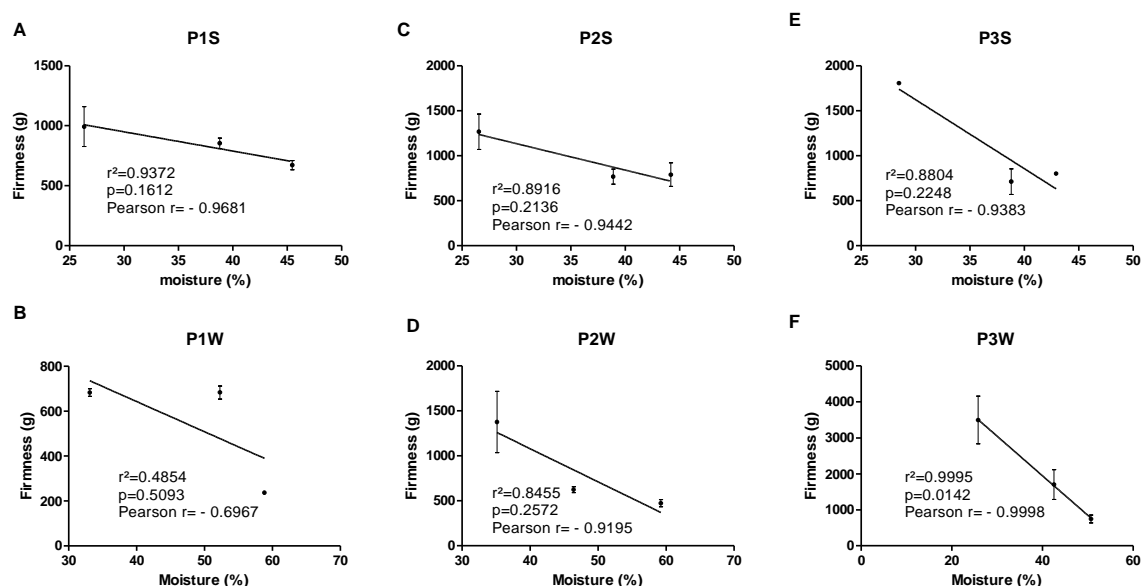


Figure 4. Pearson's correlation for moisture (%) and firmness (g). Where P1; P2; P3 are the three producers; S means summer; W means winter. Graphs A and B show the results for producer P1 in summer and winter, respectively. Graphs C and D present the results for producer P2 in summer and winter, respectively. Graphs E and F show the results for producer P3 in summer and winter, respectively.

DISCUSSION

Artisanal cheeses are considered unique as their sensory diversity derives from the lack of standardization of the types and concentration of microorganisms involved in the manufacture of the product (Bachmann et al., 2011), as well as the different environmental characteristics which influence the proteolysis, among other transformations. The proteolysis can be catalyzed by enzymes from different origins: (i) produced by the microbiota naturally present in the raw milk, (ii) from added microorganisms, (iii) naturally present in raw milk and/or (iv) from the milk coagulation agent (McSweeney, 2004; Bachmann et al., 2011).

TRICINE-SDS-PAGE

Casein is the main constituent of cheese and can be classified according to composition and amino acid sequence into four fractions: α_{S1} , α_{S2} , β and κ -casein

(Perna et al., 2014). The manufacture of all varieties of cheese involves the coagulation of the casein. For enzymatic coagulation, a network that retains the milk fat occurs. During coagulation, κ -casein is hydrolyzed in the primary phase of rennet action and loses its protective capacity, resulting in the release of the hydrophilic C-terminal segment and in the formation of small peptides during coagulation. When pure renin is used as the coagulant, peptide bond hydrolysis occurs between amino acids Phe-105 and Met-106 (Fox, 1993). The proteolytic activity during cheese ripening depends on several factors, such as the type of coagulant used, residual action of the coagulant and native milk proteases, which may be influenced by the moisture content of the cheese as well as the temperature and relative humidity of the ripening place (Fox et al, 2015)).

Different casein fractions and protein breakdown products can be observed throughout ripening by electrophoresis, which is probably one of the most used techniques to monitor the cheese ripening process (Perna et al., 2014). The α -casein fractions are more susceptible to proteolysis whereas the degradation of β -casein is much less common (Fox et al., 2004).

Electrophoresis techniques are based on the separation of proteins according to molecular weight and allow the comparison of the intensity of the stained polypeptide chains in a polyacrylamide gel. Electrophoresis can be used to monitor casein hydrolysis into smaller compounds, to evaluate the formation of peptides of different molecular weights, which helps the understanding of the proteolysis that occurs during cheese ripening (Baldini, 1996; Zhao et al., 2019). The TRICINE-SDS-PAGE results in this study showed that proteolysis could be related to the duration of ripening, as no sample showed any signs of proteolysis after three days of maturation, and as it was possible to verify higher intensity of low weight bands (peptides) over the ripening time.

Proteolysis could also be related to the season of production, as higher hydrolysis was detected in summer than in winter. During summer, temperatures and relative humidity are higher, which can influence the activity of proteases. But mostly this analytical tool showed the relationship between proteolysis and the producer of origin of the samples. This was expected, to some extent, as the endogenous microbiota present in the *pingo* and in the raw milk was characteristic of each property and it results in the typical *Terroir* of each producer.

However, the behavior of the samples from P3 suggested that other factors may also have exerted some influence. In the manufacturing of AMC-Serro, salting is performed on the surface of the cheese and whey drainage occurs for three days, while the cheeses are in the molds. On the third day, the product is unmolded and placed on wooden shelves in the ripening room to begin maturation. During the ripening, the cheeses may be rinsed with running water, to remove surface fungi that may develop, and the thickening of rind occurs. Washing occurs every two or three days, depending on the ambient temperature and humidity conditions of the ripening room (Chaves et al., 2018). The producer #3 was the only one in this study to wash periodically the rind of the ripening cheeses, thus preventing the growth of fungi on the surface. Unlike P3, the producers #1 and #2 did not wash the cheeses during the ripening, allowing the development of mold on their surfaces. It is possible that the metabolites of these fungi have penetrated the interior of the cheeses and influenced the proteolysis, which would explain the differences observed in the electrophoretic profile of the cheeses studied. It was also observed that the P1 samples showed similar behavior in the two seasons studied, probably due to the characteristics of temperature in the maturation room of this producer, that showed the least variation throughout the year among all producers.

The differences in the electrophoretic profile of the 3 producers attest that there is a lack of standardization among their processing units. Future supervision should be given to these producers in order to guide them to take measures to minimize the differences.

Ripening extension and depth indices

The evaluation of the ripening process in cheeses may be achieved by the analysis of two ripening indices: the ripening extension index and the ripening depth index, where the soluble nitrogenous substances that accumulate, due to casein hydrolysis, are quantified. The ripening extension index reflects the amount of proteins and peptides that are soluble in water at pH value of 4.6 - the isoelectric point of caseins, which, when intact, remain insoluble. The ripening depth index indicates the amount of low molecular weight nitrogenous substances (free amino acids, small peptides, among others) accumulated during ripening, that remains soluble in a 12% TCA solution (Pereira, 2010).

The ripening extension index is related to primary proteolysis, associated with the action of milk endogenous proteases and the enzymes used as coagulants on α S-caseins and, to a lesser extent, on β -casein, giving rise to high and medium molecular weight peptides (Roseiro et al., 2003; Fox et al., 2004). Since all producers used the same commercial coagulant from the same supplier, the differences found between the samples for the proteolysis extension index, in the same season, should be credited to the differences due to the endogenous milk proteases or proteases produced by the microorganism present of each producing farm. Milk has some endogenous proteases, among which plasmin is the main one. It is an alkaline protease, which preferably hydrolyzes β -casein to γ -casein (Fox et al., 2004; Guerreiro et al., 2013).

Also, as very little proteolysis was detected during winter, it is reasonable to infer that the activity of these proteases was favored by the higher temperature, characteristic of the summer season, as has already been stated by other authors for Mozzarella cheese (Guinee, 2001; Costa Júnior et al., 2009). This may also explain why the samples from P2 showed less extension of proteolysis, even in the summer: as the ripening room in this farm is thoroughly protected from the sun, the temperature during the ripening period remained lower over the whole year. It is also noteworthy that the practice of washing the cheese rind throughout maturation, characteristic of this region and applied only by producer #3, seems to have led to a lower ripening extension index, especially in winter, when compared to producers #1 and #2. It is possible that this practice contributed to causing a reduction in the cheese temperature, reducing the enzymatic activity.

The ripening depth index represents mostly the presence of smaller peptides (from 2 to 20 amino acids) which are formed by the further hydrolysis of the larger peptides generated by the coagulant proteases in the first stages of maturation. In general, the enzymes secreted by the microbiota are responsible for this stage of proteolysis (Pereira et al., 2007). The results for this index showed the same behavior and profile as the results obtained for the extension index, probably for the same reasons. However, for P3, the washing process may also have interfered in the growth of superficial microorganisms, hindering even further the proteolysis during winter. It is remarkable, nonetheless, that this procedure did not prevent proteolysis in the cheeses from P3 to reach the same levels as the samples from P2, in the summer, probably due to the higher temperature that

was achieved in the ripening room, exposed to the afternoon sun, between washes.

AMC-Serro studied by Pinto et al. (2011) presented proteolysis extension values around 12% and close to 7% for proteolysis depth, after 8 days of ripening, which are within the range observed in this study for the samples from P3, also a typical rind washed AMC-Serro producer.

Several regions in the state of Minas Gerais produce AMC like the ones produced in Serro. Cheeses produced in these regions were evaluated in studies by Costa Junior et al. (2009) and Silva et al. (2011), who studied the AMC-Canastra, and Sobral et al. (2015) who studied the AMC-Araxá and AMC-Cerrado, respectively. In these studies, cheeses presented ripening extension indices of 13.55% (Araxá), 13.14% (Cerrado) and 10.64% (Canastra). The ripening depth indices were 8% (Araxá), 8.94% (Cerrado) and 4.66% (Canastra). The AMC-Canastra were ripened for 8 days and AMC-Araxá and AMC-Cerrado were evaluated for up to 60 days of ripening. It was observed that proteolysis increased over the ripening time for the AMC of the different regions studied.

Moisture and firmness

According to Resolution No. 7 (Brasil, 2001), which regulates and supervises the manufacture of artisanal cheeses in Brazil, AMC are supposed to be medium-moisture cheeses, with moisture content between 36.0 and 45.9%. In this study, all cheese samples produced in summer presented moisture values within this range, from the beginning of the ripening process. However, after 60 days of ripening, regardless of the season, all samples were classified as low-moisture cheeses, with moisture content under 36%. More concerning was the finding about the water loss speed during the winter. According to the same Resolution (No. 7), AMC must be matured for at least 17 days, period during which the cheeses must reach the regulatory moisture, that has the purpose to ensure the safety and the quality of the product. The samples from P1 and P2 showed moisture contents higher than 45.9%, after 17 days of ripening, in winter, qualifying as high-moisture cheeses. Water loss for the samples from P1 and P2 did not change with the seasons, probably due to the location of the maturation rooms on these farms, sheltered against the sun and, thus, with less variation in temperature and relative humidity throughout the year. As the samples showed

higher initial moisture in winter, it was not possible to reach the desired final moisture after only 17 days of ripening, during this season. Machado et al. (2004), when analyzing AMC-Serro after 6 days of ripening during winter, also classified them as high-moisture cheeses. The samples from P3 showed a somewhat unexpected behavior, sustaining higher water loss in winter than in summer, which may be related to the proteolysis that occurred differently during the two seasons: proteolysis was very limited in the samples from P3 in winter but not in summer.

There is a correlation between cheese firmness and the amount of intact α -caseins present, which is explained by the fact that casein decomposition products are mostly water soluble and therefore do not contribute to the protein matrix. In addition, each peptide bond that is cleaved generates two new ionic groups that compete for the available water. Thus, water previously used for protein chain solvation is bound to the new ionic groups (Lamichhane et al., 2018). As a consequence, high levels of proteolysis tend to decrease water loss during ripening as well as to reduce cheese firmness over time.

Instrumental firmness determines shear strength, measured at maximum force and expressed in grams (Marinho et al., 2015). Cheese texture is largely dependent on the relationship between casein and moisture (McSweeney et al., 2006; Zhao et al., 2019). In the present experiment a fairly good negative correlation between water loss and firmness could be verified: as a decrease in moisture was observed, the cheese samples became increasingly resistant to deformation, that is, firmer. The same can be said about proteolysis. If the extent of proteolysis (Figure 2A) is compared with firmness (Figure 3B), for all producers, hydrolysis was higher in summer and firmness was lower in the same season, in a negative relationship, as expected. Likewise, there was a lesser water loss when there was greater hydrolysis, for all producers.

CONCLUSION

The present paper shows the first attempt, to the extent of our knowledge, to relate the proteolysis during ripening of AMC-Serro with the different producing farms and seasons. In general, proteolysis was more intense in summer than in winter, due to the higher temperatures and moisture, which influence the enzymatic activity in the cheese. Other factors directly or indirectly influencing the

temperature also determined the behavior of proteolysis, such as ripening room location and rind-washing, showing large differences among the three producers evaluated. The degree of proteolysis also influenced the water loss during ripening, with great influence on cheese safety.

The results obtained in this study may be used to better understand the transformations during ripening of AMC-Serro and help the small traditional farmers improve their product's quality and stability.

REFERENCES

AOAC. Association of Official Analytical Chemists (2010), "Official methods of analysis of the AOAC", International 18th Ed. Washington, DC. AOAC.

Bachmann, H. P., Fröhlich-Wyder, M. T., Jakob, E., Roth, E., Wechsler, D., Beuvier, E., & Buchin, S. (2011). Cheese: Raw Milk Cheeses. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 652–660. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00519-7>

Brasil (2001), Resolução n. 7, de 28 de novembro de 2000. "Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal", Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jan. 2001.

Carneiro, J.O; Stephan, M.P; Castro, I. M.; Chaves, A.C.S.D.; Santos, A.A.; Azevedo, T.L. and Koblitz, M.G.B. (2019) Optimization of the electrophoresis tricine-sds-page for simultaneous detection of protein and peptide in artisanal cheese. *J Agr SciTech-Iran*, 9, 423-427. <https://doi.org/10.17265/2161-6264/2019.06.006>

Cavalcante, J.F.M.; Andrade, N.J.; Furtado, M.M.; Ferreira, C.L.L.F.; Pinto, C.L.O.; and Elard, E. (2007), "Manufacture of regional coalho type cheese by using pasteurized and standardized cow milk added with endogenous lactic acid culture", *Food Sci. Technol (Campinas)*, 27 (1), 205-214. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100036>

Chaves, A.C.S.D.; Monteiro, R.P. and Machado, R.L.P. (2018) "Etapas do processo de produção", in: Monteiro, R.P.; Matta, V.M. da (Ed.). *Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar*. Brasília, DF: Embrapa. cap. 4, pp.55-70. Available in <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf> Access in 14/09/2019.

Costa Junior, L.C.G.; Costa, R.G.B.; Magalhães, F.A.R.; Vargas, P.I.R.; Fernandes, A.J.M. and Pereira, A.S. (2009), “Avaliação da proteólise de queijo artesanal de uma unidade produtora da Serra da Canastra nas quatro estações do ano”, Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 64 (371), 62-69.

IDF (1993) Milk determination of nitrogen content. IDF standard 20B. International Dairy Federation, Brussels.

IPHAN (National Institute of Historical and Cultural Heritage) (2008). Immaterial heritage. Registered goods. 13. Artisan way to make Minas cheese in Serro, Canastra and Salitre regions.

Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M. and Guinee, T.P. (2004). “Cheese: An Overview”, In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (3th Ed.) London: Elsevier Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80060-5](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80060-5)

Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H. and O'Mahony J.A. (2015) Milk Proteins. In: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_4

Guerreiro, J.S.; Barros, M.; Fernandes, P.; Pires, P. and Bardsley, R. (2013), Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. Food Chem., 136 (3-4), 1526-1532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.066>

Guinee, T.; Feeney, E. and Fox, P. (2001), Effect of ripening temperature on low moisture Mozzarella cheese: 2. Texture and functionality. Le Lait, INRA Editions, 81(4), 475-485.

Kuchroo, C.N., and Fox, P.F. (1982), Soluble nitrogen in Cheddar cheese. Comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft 37, 331-335.

Lamichhane, P.; Kelly, A.L. and Sheehan, J.J. (2018), Symposium review: Structure-function relationships in cheese, J. Dairy Sci. 101(3), 2692-2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13386>

Machado, E.C.; Ferreira C.L.L.F.; Fonseca L.M.; Soares F.M. and Pereira F.N.J. (2004), Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. Ciênc. e Tecnol. de Alime. 24 (4), 516-521. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400006>

Marinho, M.T.; Zielinski, A.A.; Demiate, I.M.; dos Bersot, L.S.; Granato, D. and Nogueira, A. (2015) Ripened semihard cheese covered with lard and dehydrated rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves: Processing, characterization, and quality traits. J. Food Sci. 80, 2045–2054. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12988>

- McSweeney, P.L.H. (2004), "Biochemistry of cheese ripening", *Int. J. Dairy Technol.*, 57, 127-144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
- McSweeney, P.L.H.; Hayaloglu, A.A.; O'Mahony, J.A. and Bansal, N. (2006) Perspectives on cheese ripening, *Aust. J. Dairy Technol.* 61(2), 69-77. <https://doi.org/10.1201/b17297-8>
- Monteiro, R.P. (2018), "O Queijo Minas Artesanal e seu Potencial para a Agroindústria Familiar", in: Monteiro, R.P.; Matta, V.M. (Ed.). *Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar*, Brasília, DF: Embrapa, cap. 1, pp. 11-14. Available in <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf> > Access in 14/09/2019.
- Pereira, C.I., Gomes, E.O., Gomes, A.M.P. and Malcata, F. X. (2008). Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food Chemistry*, 108(3), 862–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.050>
- Pereira, C.I., Neto, D.M., Capucho, J.C., Gião, M.S., Gomes, A.M.P. and Malcata, F. X. (2010). How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1335–1344. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2294>
- Perin, L.M., Savo Sardaro, M. L., Nero, L. A., Neviani, E. and Gatti, M. (2017). Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. *Food Microbiology*, 65, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.005>
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., and Gambacorta, E. (2014). Effects of genetic type, stage of lactation, and ripening time on Caciocavallo cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 1909–1917. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7288>
- Pinto, M.S., Lempk, M.W., Cabrini, C.C., Saraiva, L.K.V., Cangussu, R.R. da C., and Simões Cunha, A.L.F. (2017). Características Físico-Químicas E Microbiológicas Do Queijo Artesanal Produzido Na Microrregião De Montes Claros – MG. *Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 71(1), 43. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v70i1.514>
- Roseiro, L. B., Garcia-Risco, M., Barbosa, M., Ames, J. M., and Wilbey, R. A. (2003). Evaluation of Serpa cheese proteolysis by nitrogen content and capillary zone electrophoresis. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 99–104. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00079.x>
- Santilli, J. (2015). O Reconhecimento De Comidas, Saberes E Práticas Alimentares Como Patrimônio Cultural Imaterial. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 10(3), 585–606. <https://doi.org/10.12957/demetra.2015.16054>

Salum, P., Govce, G., Kendirci, P., Bas, D., and Erbay, Z. (2018). Composition, proteolysis, lipolysis, volatile compound profile and sensory characteristics of ripened white cheeses manufactured in different geographical regions of Turkey. *International Dairy Journal*, 87, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.011>

Schägger, H. and Jagow, G.V. (1987), “Tricine-Sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the ranger from 1 to 100 kDa”, *Anal. Biochem.*, 166, 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)

Silva, J.G.; Abreu, L.R.; Ferreira, E.B.; Magalhães, F.A.R. and Piccoli, R.H. (2011), “Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra”, *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 66(380), 16-22.

Sobral, D; Pinto, M.S.; Teodoro, V.A.M.; Carvalho, A.F. de; Costa, R.G.B. and Miguel, E.M. (2015). Comparação dos índices de proteólise de queijos artesanais das regiões do Cerrado e Araxá. In: *Congresso Nacional de Laticínios*, 30. 2015, Juiz de Fora. Anais... Belo Horizonte: EPAMIG, 5 p.

Zhao, X.; Zheng Z.; Zhang, J.; Sarwar, A.; Aziz, T. and Yang, Z. (2019), “Change of proteolysis and sensory profile during ripening of Cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine”, *Food Sci Nutr.*, 7(4), 1540-1550. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1003>

Capítulo 4

Sensory evaluation of Artisan Minas Cheese of Serro over 60 days of ripening using CATA questions

Juliana de Oliveira Carneiro¹; Marcela de Alcantara²; Daniela De Grandi Castro Freitas-Sá²; Maria Gabriela Bello Koblit¹; Ana Carolina Sampaio Doria Chaves²

¹Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN) – Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO)

²Embrapa Food Technology – Brazilian Agricultural Research Corporation

* Submitted in the British Food Journal

Abstract

Purpose

The Serro region, located in Minas Gerais, Brazil, is known for its tradition of producing Artisan Minas Cheese (AMC). The AMC of Serro is of great historical and socioeconomic importance but there is little scientific information about its sensory characteristics. Thus, this study aimed to sensory characterize this cheese over 60 days of ripening at the farms where it was produced, in two seasons, winter and summer.

Design/methodology/approach

Cheeses from three different farms/producers were collected in the winter and in the summer. The cheeses with 17, 30 and 60 days of ripening, were assessed as to the sensory acceptance and its were characterized using Check-All-That-Apply (CATA). The results of the acceptance tests were evaluated statistical analysis applying a ANOVA with the Tukey test and the results of CATA analysis was performed using the correspondence analysis.

Findings

The results showed that the differences were greater because of the producers rather than due to the ripening time. In winter, the cheeses with the shortest ripening time studied (17 days) were the most accepted and the descriptors in the CATA questions were "moist appearance", "soft" and "creamy". In summer, the most ripened cheeses (60 days) were more accepted and described as having "thick crust", "dried up" and "firm".

Originality

This study is one of the few that used the CATA questions to obtain a sensorial characterization of AMC of Serro at during 60 days of ripening. The results can be used for helping the standardization, protection, and preservation of this cheese by providing information about its unique characteristics. Another key characteristic was that the cheeses used in this study were ripened on farms in uncontrolled environmental conditions.

Keywords: acceptance test, traditional cheese, terroir.

INTRODUCTION

In Brazil, the state of Minas Gerais is known for its cheese production. The state is one of the largest producer of cheese and it is more experienced in cheese processing as it has a long history of cheese production (Martins *et al.*, 2015). There are seven different cheese production regions in Minas Gerais where artisanal cheese production with raw milk is allowed. One of these regions is the Serro region. Artisan Minas Cheese of Serro (AMC-Serro) is of great historical and socioeconomic importance, but there is little scientific information about its sensory characteristics (Monteiro *et al.*, 2018). This cheese is recognized by the Institute of National Historical and Artistic Heritage (IPHAN - “Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional”) as an intangible heritage of Brazil and was the first Brazilian cheese to receive a geographical indication from the National Institute of Intellectual Property (INPI - “Instituto Nacional de Propriedade Intelectual”) in 2011 (IPHAN, 2008; INPI, 2011; Monteiro, 2018).

The production of AMC-Serro uses raw milk, *pingo* as an inoculum and an enzymatic coagulant. The *pingo* is a salted whey with endogenous bacteria drained from the cheese after the second day of draining. Normally, the *pingo* is stored at room temperature overnight to be used in the next day’s cheese production (Castro *et al.*, 2016). With raw milk, the diversity of the microbiota cannot be standardized, so artisanal cheeses normally have a great sensorial diversity (Bachmann *et al.*, 2011). In Brazil, by legal requirement, artisan cheeses must be processed on farms with raw milk and it should be ripened on the farm at in room temperature and relative humidity (Monteiro, 2018).

The sensory characteristics are very important for acceptance by the consumer. The taste and aroma of the cheese are considered important criteria by consumers when choosing the cheese at the time of purchase (Stone *et al.*, 2012; Licitra *et al.*, 2019). In cheeses, color, aroma, flavor, and consistency stimulate the sensory receptors and provoke reactions of acceptance or rejection of the product by the consumer (Issanchou, 2008).

Check-all-that-apply (CATA) is a descriptive and rapid sensory method that has been used to obtain information on consumers’ perceptions of the sensory characteristics of food products (Adams *et al.*, 2007). This method consists of a structured questionnaire with a list of descriptors that were previously defined by a group of trained panelists, by consumers or with data from the literature. The

consumers select all the listed descriptors that they consider appropriate to describe a certain product (Jaeger *et al.*, 2015). Among the main advantages of the CATA methodology are the simplicity and speed with which the analyses are performed (Adams *et al.*, 2007). The main limitation of this technique, according to Dooley *et al.* (2010), is that the intensities of the attributes presented in the list are not measured. The CATA method can be used in conjunction with affective sensory tests, such as acceptance tests. Through the product characterization is carried out by consumers, it is possible to understand the sensory attributes that can determine the acceptance of a product (Plaehn, 2012; Ng *et al.*, 2013).

Characterizing the sensory profile of artisanal cheeses allows the standardization, protection, and preservation of these products. In addition, this characterization provides information about their unique characteristics that make them potential candidates for a protected designation of origin (DOP). This is quite common in European cheeses (Bemfeito *et al.*, 2016).

In summary, this study aimed to sensory characterize AMC-Serro over 60 days of ripening on the farms where the milk was produced, in two seasons, winter and summer.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

This study used AMC-Serro from three different farms/producers (P1, P2 and P3). Each piece of cheese weighed approximately 1 kg. All samples were produced with raw milk and followed the traditional processing techniques from the Serro region. The *pingo* (the salted whey collected on the second day after coagulation) was used as an inoculum and the coagulant agent was the industrial microbial chymosin from *Aspergillus niger* var. *awamori* manufactured by Ha-La®, Chr. Hansen. The results presented are the average of two batches of cheese processed each day.

The cheeses were ripened in the “cheese room” on the farms where the raw milk and the cheeses were produced. Cheeses from P3 were rinsed every two or three days along the ripening period, while the P1 and P2 products did not apply this step. The cheese from P3 is considered to be the typical, the traditional AMC-Serro.

Samples were collected at 17, 30, and 60 days (17d, 30d, and 60d) of ripening from the three farms in the winter of 2017 and in the summer of 2018. The samples were coded as follows: 17dP1, 17dP2, 17dP3, 30dP1, 30dP2, 30dP3, 60dP1, 60dP2, and 60dP3.

All the farms were in the county of Serro, but the ripening rooms of each property had different characteristics, which caused variations in temperature and relative humidity throughout the year. The ripening room in P1 was in an area with little exposure to direct sun. It had an average temperature of 18.2 °C and 68% relative humidity in winter, and 21 °C and 78% humidity in the summer. The ripening room in P2 was in the shade, under the canopy of a tree. It had an average temperature of 17 °C and 72% relative humidity in the winter and an average temperature of 20 °C and 81% humidity in the summer. In P3, the ripening room was exposed to direct afternoon sunlight. It had an average temperature of 18.5 °C and 67% relative humidity in winter, and an average temperature of 22.5 °C and 78% humidity in summer. The temperature and relative humidity data were recorded using a thermo-hygrometer (Instrutherm Mod. HT-70, São Paulo, BR) according to the manufacturer's instructions. The measuring instrument was placed on a shelf of cheese in the ripening room at a height of 1.8 m. The ripening rooms, called the “cheese room”, had approximately 20 m². They were made of brick and lined with ceramic and the cheeses were ripened on wooden shelves.

The samples (whole cheeses, three of each level of ripening) were packed in plastic bags and coded for refrigerated transportation to the Embrapa Food Agroindustry facility in Rio de Janeiro. Before the sensory evaluation, all the samples of AMC were analyzed to determine their microbiological safety required by the Brazilian legislation (Brasil, 2001).

Consumers

The first stage of the study was carried out with the cheeses produced in the winter (July 2017). The test was developed with 80 consumers. The second stage of the test was conducted with cheeses produced in the summer (February 2018) with 100 consumers participated. The consumers were employees and trainee of the Embrapa Food Agroindustry.

Sensory Analyses

The sensory analyses (winter 2017 and summer 2018) were performed in the sensory analysis laboratory at Embrapa Food Agroindustry. The Ethics Committee approved this study, the approval number is CAAE 21757913.7.0000.5284.

The analyses, in both seasons, were performed using the same methodology. First, consumers analyzed the appearance, then the aroma/flavor/texture attributes. The test was a sequential monadic, design and sample presentation orders were balanced in each serving position using the Williams Latin Square design (Williams, 1949). Each consumer tested the samples encoded with three random digits. The samples were evaluated using the acceptance test (Peryam and Pilgrim, 1957) and the CATA questions (Ares et al., 2011). The sensory acceptance test was performed using the 9-point hedonic scale (1=dislike extremely; 9=extremely like). Samples were considered accepted when presented score above 6.

The terms used in the CATA questions (Table I) were selected using a group of panelists, and the terms were based on a previous study carried out by Freitas-Sá et al. (2016). The descriptors considered important to characterizing the AMC-Serro were chosen using the cheeses which were evaluated. The order of presentation of the descriptors was balanced among the consumers (Ares et al., 2014).

To assess the appearance, the cheeses were cut in half so the evaluators could simultaneously evaluate the interior and exterior of the product (Figure 1). The CATA questions for assessing the appearance of the cheese contained 15 terms (Table I).

The test of aroma/flavor/texture attributes performed in individual booths under white light. Samples (cubes of cheese with a 2 cm edge, weighing about 20 g) were served at controlled ambient temperature (25 ± 2 °C) in a disposable dish. The rind of the cheeses was removed so that the appearance of the product would not influence on the perception of the taste. Consumers were asked to evaluate flavor, aroma, and texture attributes of each sample. In the tray with the samples, the consumers had a cream-cracker and a glass of mineral water at room temperature, they helped to clean the palate between the samples. The

CATA questions contained 29 terms relating to the attributes of the flavor, aroma, and texture (Table I).

| APPEARANCE | AROMA/FLAVOR/TEXTURE | |
|-------------------------------------|---------------------------------|------------|
| Yellow rind color | Buttery flavor/aroma | Hard |
| Cheese with irregular holes | Milk flavor/aroma | Soft |
| White color inside | Mild flavor/aroma | Gritty |
| Thick crust | <i>Requeijão</i> * flavor/aroma | Elastic |
| Smooth texture inside of the cheese | Parmesan flavor/aroma | Succulent |
| Cream color inside | Strong flavor/aroma | Fatty |
| With whitish spots on the rind | Bitter taste | Firm |
| Roughness in the rind | Salty taste | Sticky |
| Cheese with rounded eyelets | Sour taste | Crumbly |
| Cream color of the rind | Sweet taste | Spicy |
| Dried up | Aroma of old | Fruity |
| Moist appearance | Acid aroma | Cured |
| Golden rind color | Bitter residual taste | Creamy |
| Homogeneous rind | Rancid aroma | Curd aroma |
| Yellow color inside | Corral aroma | |

Table I: Terms used in the CATA Questions (adapted from Freitas-Sá et al., 2016).

**Requeijão* is a typical Brazilian cheese.



Figure 1: Photograph of AMC-Serro samples to perform Sensory Analysis of the Appearance of cheeses with 60 days of ripening, from left to right 60dP1, 60dP2 and 60dP3.

Font: own authorship

Data analysis

The results of the acceptance tests were evaluated using statistical analysis and applying ANOVA with the Tukey test and $p < 0.05$ was considered significant. This evaluation used the GraphPad Prism (5.0)[®] software.

The results of CATA analysis was performed using the correspondence analysis technique using the XLSTAT® 2011.4.01 software.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the tests for acceptance can be observed in Tables II and III. The correspondence analysis of the descriptors of the sensory characteristics determined using the CATA questions are presented in Figures 2, 3, 4, and 5. In general, the results showed that the differences varied more by producer than by ripening time.

| SAMPLE | WINTER/2017 | SUMMER/2018 |
|--------|---------------------|---------------------|
| 17dP1 | 4.61 ^{bcA} | 4.59 ^{cA} |
| 17dP2 | 6.40 ^{aA} | 6.17 ^{abA} |
| 17dP3 | 7.33 ^{aA} | * |
| 30dP1 | 5.15 ^{bA} | 3.40 ^{dB} |
| 30dP3 | 7.38 ^{aA} | 7.10 ^{aA} |
| 60dP1 | 4.06 ^{cA} | 3.12 ^{dB} |
| 60dP2 | * | 4.67 ^{cA} |
| 60dP3 | 4.79 ^{bcA} | 5.43 ^{bcA} |

Table II: Result of the Acceptance Test of the appearance of artisan cheeses from the three producers studied during the ripening in summer and in winter.

* means problems with samples, which could not be part of the sensory analysis.

Equal capital letters do not differ statistically between the seasons

Lowercase letters do not differ statistically between the samples of the same season.

| SAMPLE | WINTER/2017 | SUMMER/2018 |
|--------|---------------------|---------------------|
| 17dP1 | 6.25 ^{abA} | 5.70 ^{aA} |
| 17dP2 | 6.89 ^{aA} | 5.76 ^{bA} |
| 17dP3 | 6.70 ^{aA} | * |
| 30dP1 | 5.99 ^{aA} | 6.09 ^{aA} |
| 30dP3 | 5.57 ^{bA} | 6.26 ^{aA} |
| 60dP1 | 6.05 ^{aA} | 4.74 ^{bB} |
| 60dP2 | * | 5.62 ^{abA} |
| 60dP3 | 5.86 ^{bA} | 6.38 ^{aA} |

Table III: Result of the Acceptance Test for aroma/flavor/texture of artisan cheeses from the three producers studied over the time of ripening in summer and winter.

* means problems with samples, which could not be part of the sensory analysis.

Equal capital letters do not differ statistically between the seasons and lowercase letters do not differ statistically between the samples of the same season.

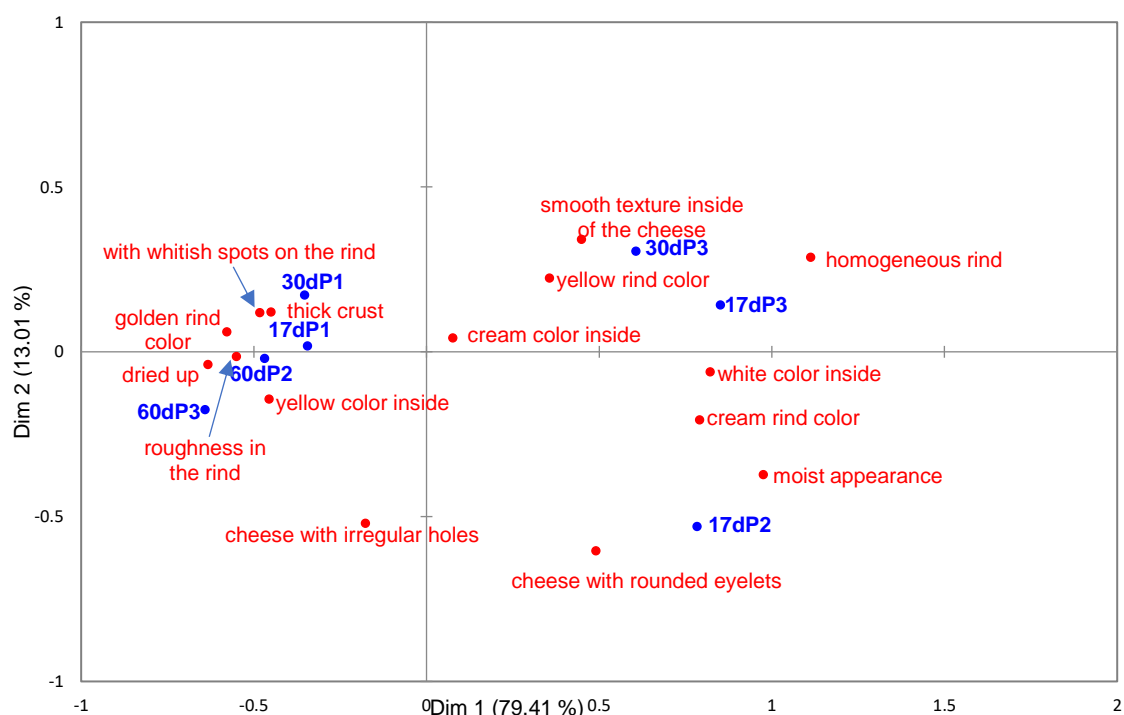


Figure 2: Correspondence Analysis for appearance determined by the CATA questions – Winter 2017.

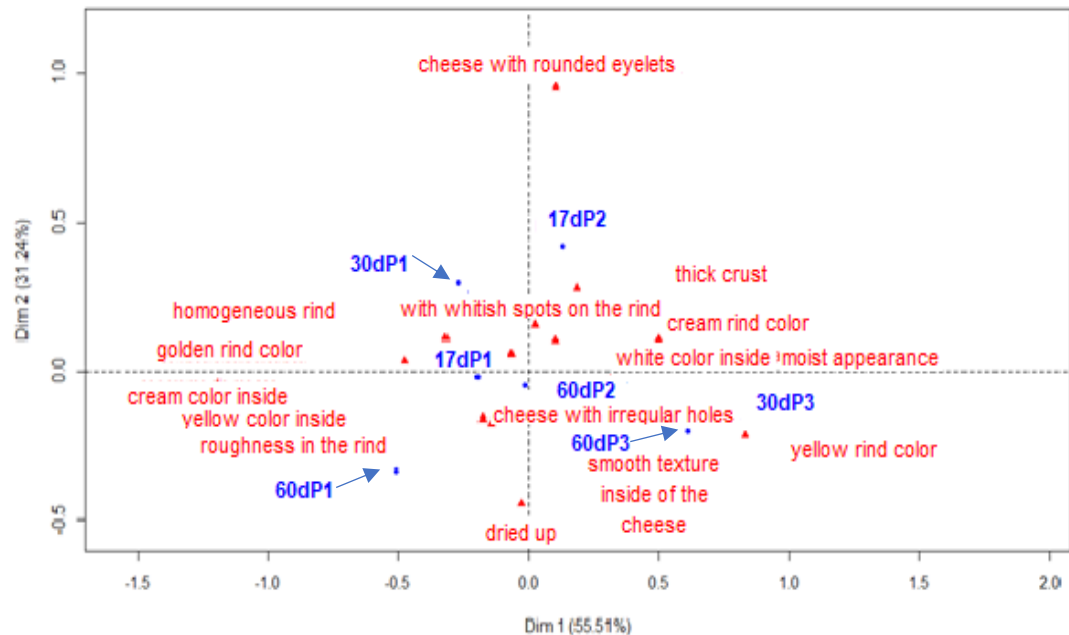


Figure 3: Correspondence Analysis for appearance determined by the CATA questions of summer of 2018.

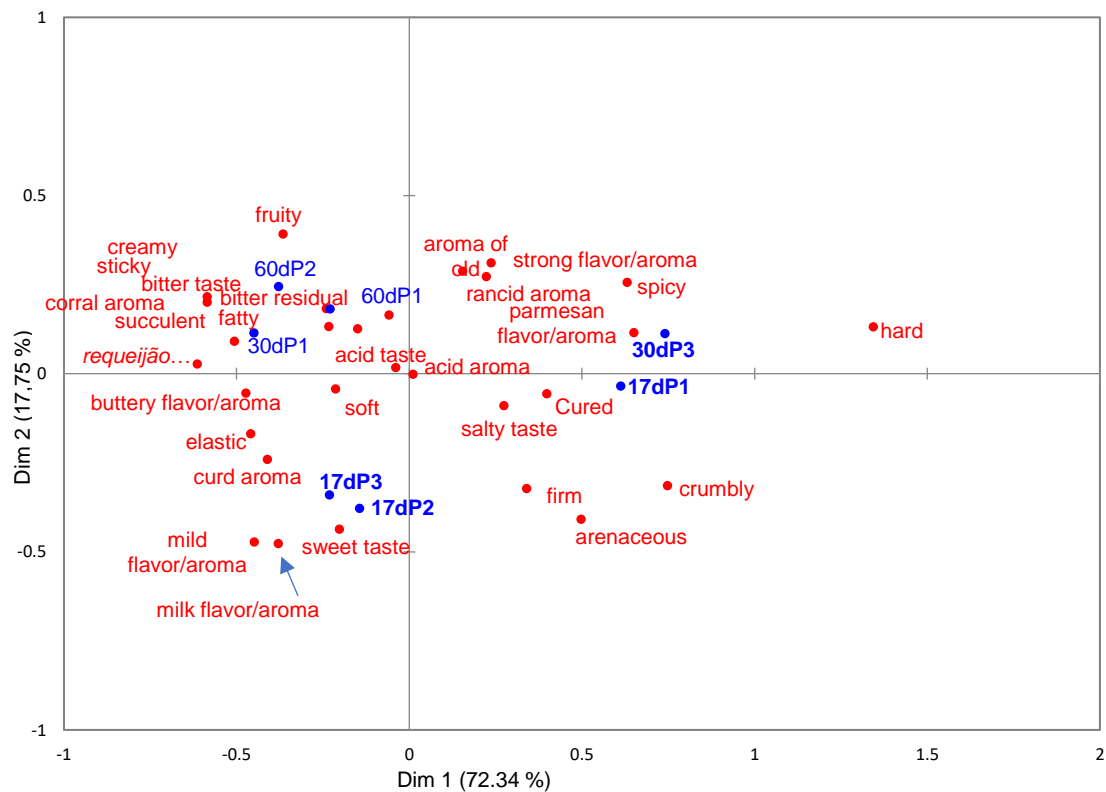


Figure 4: Correspondence Analysis for aroma/flavor/texture evaluation determined by the CATA questions in winter of 2017.

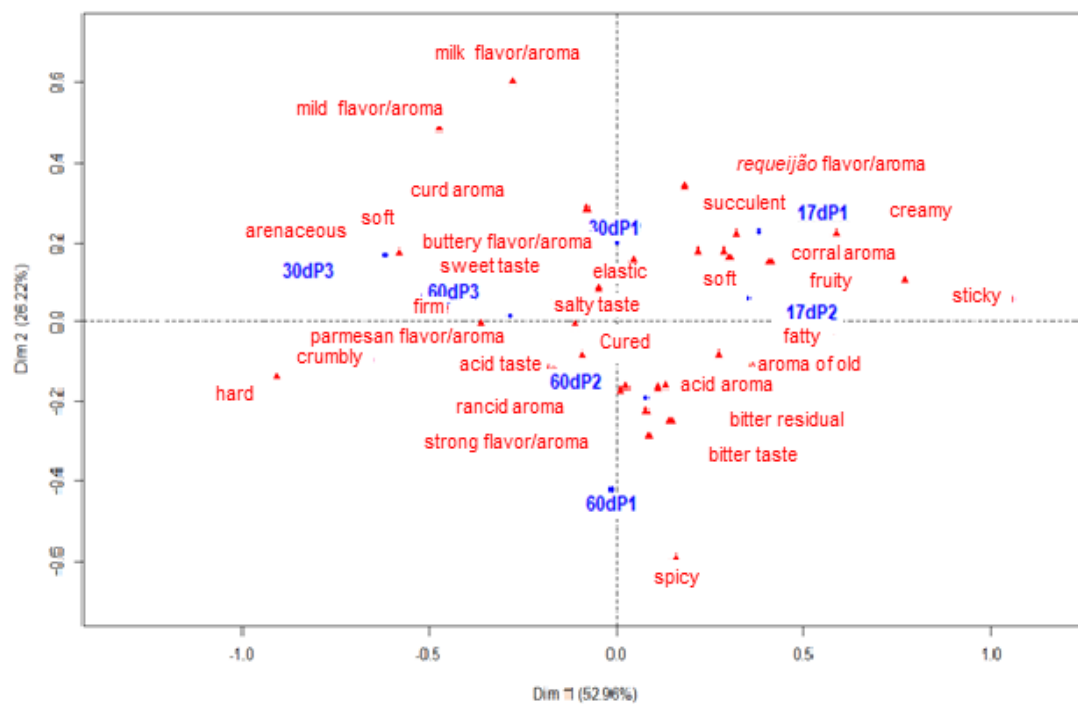


Figure 5: Correspondence Analysis for aroma/flavor/texture evaluation by the CATA questions of Summer of 2018.

During ripening, cheese undergoes in a series of chemical and biochemical reactions that change the sensory characteristics, the appearance, flavor, aroma, and texture (McSweeney, 2004). The artisan cheeses made from raw milk have sensory characteristics influenced by the production and ripening location, local edaphoclimatic variations, endogenous microbiota, and the characteristics of milk *in natura* (Martins et al., 2015).

In winter cheeses, the samples that had better acceptance of appearance were 17dP2, 17dP3, and 30dP3 (Table II). Each of these had scores above 6 and no significant differences were observed between them. In the summer, the samples that scored above 6 were 17dP2 and 30dP3, and there was no significant difference between them (Table II). Only cheeses 30dP1 and 60dP1 showed significant differences in the acceptance concerning the appearance between the two studied seasons. The other samples did not differ statistically between winter and summer (Table II).

According to the correspondence analysis of the CATA questions for appearance that there was a similarity between the P1 samples with 17 and 30 days of ripening, both in the winter and in the summer (Figures 2 and 3). The P3 cheeses with 17 and 30 days of ripening also showed similarity. However, the P2 samples showed different characteristics in the two seasons studied. It was also noted that the P2 and P3 samples with 60 days of ripening showed similar characteristics, in the winter and in the summer (Figures 2 and 3). The descriptors most often used to characterize the appearance of the cheese produced in were “thick crust”, “with whitish spots on the rind”, “smooth texture inside of the cheese”, “roughness in the rind”, “dried up”, “cream color inside”, and “golden rind color”.

Regarding the aroma/flavor/texture evaluation, in the winter, the cheeses with the best acceptance were 17dP1, 17dP2, 17dP3, and 60dP1. Each of these cheeses had scores above 6 (Table III). In the summer, samples 17dP1, 30dP1, 30dP3, 60dP1, and 60dP3 did not differ significantly and were accepted. However, samples 17dP1 and 60dP1 were not sensorially accepted, as they had scores below 6 (Table III). Only the 60dP1 sample showed a significant difference in the aroma/flavor/texture acceptance between the two seasons studied (Tables II and III).

The correspondence analysis of the CATA questions for aroma/flavor/texture of winter samples, there was a similarity between the samples with 17 days of

ripening of P2 and P3 (Figure 3). Samples 30dP1, 60dP1, and 60dP2 also showed similar characteristics. In the summer, only samples of P3 with 30 and 60 days of ripening showed similarity (Figure 4). In general, the summer samples had more distinct characteristics than the winter samples (Figures 3 and 4). The descriptors most often used to characterize of aroma/flavor/texture were "creamy", "soft", and "firm". It is important to note that in the CATA analysis, consumers only assess whether the descriptor is appropriate or not to describe the product, it is not associated with intensity of the descriptors (Varela and Ares, 2012). In this test, consumers can choose all the terms from a given list that they think they were appropriate to describe the product under analysis (Alcântara and Freitas-Sá, 2018).

In the winter, sample 17dP2 was the only one that had acceptance in both tests (Tables II and III). In the summer, only the sample 30dP3 was fully accepted, for appearance and aroma/flavor/texture evaluation (Tables II and III). The cheeses from P2 showed the lowest similarity for CATA questions over ripening time between the two seasons studied.

The cheeses that had greater acceptance of appearance were those of P3, which scored above 7 for all the samples studied. For the appearance of cheeses from P3, the most common descriptors chosen for both seasons were "smooth texture of the cheese" and "homogeneous rind". However, the winter samples 30dP3 and 60dP3 did not have aroma/flavor/texture acceptance (Table III). The cheeses from P3 had smooth surfaces because the rinds washing of these cheeses during ripening, as is the traditional technique used in the region. Only the P3 cheeses had the rind washed, which is typical step of the traditional processing of AMC-Serro. This led to great variation between the cheeses of P3 and those of P1 and P2.

The appearance of summer samples 17dP1 and 60dP1 were not accepted, but aroma/flavor/texture of both cheeses were accepted. The summer sample 60dP1 was the least accepted, it had the lowest scores, both for appearance (3.12) and aroma/flavor/texture evaluation (4.74). The appearance of the cheeses from P1 was not accepted, probably due to the presence of fungi on the rind. In all the cheeses from P1 (including both winter and summer), the descriptor most marked for appearance was "thick crust", evidencing the presence of fungi on the surface of these cheeses, as a result of not washing the rind during ripening. The P1

cheeses since this product did not have their rinds washed during the ripening, thus allowing the growth of fungi on the surface. This version of AMC-Serro with a fungus rind is a new product in the region that is being studied and gaining new markets with this interesting added value. However, the appearance is not typical of AMC-Serro what probably explains its rejection by the consumers observed in this study that were not used to this appearance. It is important to note that the winter 60dP1 sample had the lowest score in the acceptance of appearance, but it had a good aroma/flavor/texture acceptance. According to Delgado *et al.* (2016), the fungi present on the surface may contribute to the taste of cheeses due to oxidative and enzymatic reactions, such as lipolysis and proteolysis. In addition, the metabolites of these fungi may penetrate the interior of the cheeses and influence proteolysis (Carneiro *et al.*, 2020).

In the winter, it was observed that the less ripened cheeses were better accepted, all samples with 17 days of ripening were well evaluated. This may be related to the fact that the standard Minas cheese, the most well-known and popular cheese in Brazil, is ripened for 20 days (Brasil, 2020). The cheeses with 17 days of ripening were the ones that most resembled the standard Minas cheese. In a study carried out by Resende (2014) with artisanal Minas cheeses from Campo das Vertentes (MG), which studied cheeses that had been ripened up to 30 days, the cheeses with 10 days, or the shortest ripening time, had the best acceptance. Unlike with the winter cheeses, in the summer there was a preference for more ripened cheeses. The consumers noted that cheeses with more than 30 days of ripening had more remarkable flavor. In the CATA questions, the descriptor “strong flavor/aroma” was among the most used for the samples the summer 30dP3 and winter 60dP1 and 60dP2, demonstrating that the flavor become more intense with the ripening. The flavor intensity increased as the ripening period progressed (Licitra *et al.*, 2019). The 60dP2 sample was described as having a “bitter aftertaste”, a defect that is related to an intense proteolysis. The TRICINE-SDS-PAGE results in the study by Carneiro *et al.* (2020) showed that proteolysis could be related to the duration of ripening because of the formation of peptides over the ripening time. The protein hydrolysis must be controlled during ripening to result in pleasant flavors and avoid the formation of a bitter aftertaste (Bemfeito *et al.*, 2016). Proteolysis is the most complex biochemical event that occurs during the ripening of cheese that change the texture and develop the

characteristics flavor and aroma (Pereira, 2019). This occurs not only due to the proteolysis, but also because there is formation of aromatic compounds with secondary catabolic alterations of proteolysis products.

Ripening is an important step in the manufacture of AMC. In the case of AMC-Serro, the law requires that the cheese must be matured for at least 17 days. This is according to Resolution N° 7 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), that regulates and supervises the manufacture of artisanal cheeses (Brasil, 2001). During ripening, for standardization of the quality it is important to control the temperature and relative humidity conditions, in addition to the ripening time (Monteiro, 2018). The raw milk microbiota is responsible for the diversity of aromas and flavors, especially in cheeses ripening for long periods that suffer intense proteolysis and lipolysis (Bachmann *et al.*, 2011). Carneiro *et al.* (2020) verified the relationship between proteolysis and the producer of origin of AMC-Serro since the endogenous microbiota present in the *pingo* and the raw milk are characteristic and results in specific *terroir*. The season also influences proteolysis, higher protein hydrolysis was detected in summer. In summer, temperatures and relative humidity are higher, which may influence the activity of proteases.

Some characteristics found in the present study, such as thick crust, dry appearance, softness, and intense flavor were also observed in studies carried out by Nóbrega (2012) and by Monteiro *et al.* (2018). The AMC-Serro cheeses with more than 13 days of ripening were characterized as having a dark yellow color, dry appearance, thick and firm crust, soft interior, intense flavor, a characteristic acidity, and a bitterness (Monteiro *et al.*, 2018). Serro cheeses matured for 23 days were described with characteristics such as a yellowish, rough rind and a soft texture (Nóbrega, 2012).

The following sensory characteristics were identified in AMC-Serro by Monteiro *et al.* (2018): the aroma of parmesan, the aroma of *requeijão*, the fungi appearance, with whitish spots, gritty, fatty, crumbly consistency, fruity, cured, and spicy flavor.

Ripening significantly affects the quality of the cheeses, generating changes in sensory characteristics over time (Freitas-Sá *et al.*, 2016; Monteiro and Chaves, 2018). However, according to Resende (2014), the ripening time does not

influence the consumer decision when buying this type of cheese, possibly due to the lack of standardization or the lack of a sharp taste of mature cheeses.

The cheeses studied had different characteristics, which proves the influence of temperature and relative humidity on the development of the sensory characteristics of the product. There was also a variation between the cheeses from different producers due to different approaches to rind washing during ripening. Nóbrega (2012) observed a great variation in the sensory profiles of artisan cheeses from Serro, indicating that the conditions for producing the product varied considerably between different farmers. According to Carvalho *et al.* (2019), the variability of inter-farm microorganisms is wide, while intra-farm variability is generally less (except in different seasons). This explains the sensory variety observed in the artisan cheeses studied.

The terroir of these cheeses is a result of the endogenous microbiota from the milk, the *pingo*, and the bacteria that grow on the surface of the cheese during the ripening. The amount and composition of *pingo* added to the milk varies between producers, causing variations in the intensity and speed of fermentation (Machado *et al.*, 2004; Bemfeito *et al.*, 2016). The *pingo* contains the microbiota responsible for the flavor, texture, and color that define the region where the cheese was produced (Pereira, 2019). The set of microorganisms present in the final product create its unique flavor and sensorial aspects.

CONCLUSION

The cheeses evaluated in the present study showed the sensory differences in AMC-Serro produced by three different farms/producers over the ripening. The results showed that the differences were greater because of the producers rather than due to the ripening time. This means that the different ripening conditions and the rising step of the rind of the cheese had a greater influence on the sensory characteristics of the studied products.

The results of this study showed that the absence of the rind washing step generated a great sensory change in the cheeses over the maturation. The cheeses that were not washed had fungus on the rind, which led the consumers to reject their appearance. While the appearance of these cheeses was rejected due to the irregular rinds, the flavor and aroma were more accepted.

REFERENCES

Adams, J.; Williams, A.; Lancaster, B.; Foley, M. Advantages and uses of checkall-that-apply response compared to traditional scaling of attributes for salty snacks. In: *7th Pangborn Sensory Science Symposium*. Minneapolis, USA, pp.12-16, August 2007.

Ares, G., Bruzzone, F. and Gimenez, A. (2011), "Is a consumer panel able to reliably evaluate the texture of dairy desserts using unstructured intensity scales? Evaluation of global and individual performance" *Journal of Sensory Studies*, Vol. 26 No 5, pp.363-370. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2011.00352.x>

Ares, G., Dauber, C., Fernandez, E., Gimenez, A. and Varela, P. (2014), "Penalty analysis based on CATA questions to identify drivers of liking and directions for product reformulation", *Food Quality and Preference*, Vol. 32, pp.65-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.05.014>

Bachmann, H.P., Fröhlich-Wyder, M.T., Jakob, E., Roth, E., Wechsler, D., Beuvier, E. and Buchin, S. (2011). "Cheese: Raw Milk Cheeses", Fuquay, J.W., Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed, Elsevier, London, UK, pp.652-660. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00519-7>

Bemfeito, R.M., Rodrigues, J.F., Silva, J.G.E. and Abreu, L.R. (2016). "Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil", *Journal of Dairy Science*, Vol. 99 No 10, pp.7886-7897. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11056>

Brasil (2001), Resolução n. 7, de 28 de novembro de 2000. "Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal", Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 January 2001.

Brasil (2020), Instrução Normativa Nº 66, de 21 de julho de 2020. "Dispõe sobre a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o produto denominado queijo minas padrão", Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 July 2020.

Carneiro, J.O., Chaves, A.C.S.D. Stephan, M.P. Boari, C.A. and Koblitiz, M. (2020), "Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening", *Heliyon*, Vol. 6 No 7, e04446. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04446>

Carvalho, M.M., Fariña, L.O., Strongin, D., Ferreira, C.L.L.F. and Lindner, J.D.D. (2019), "Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk", *Journal of Dairy Science*, Vol. 102 No 11, pp.9711-9720. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16373>

Castro, R. D., Oliveira, L. G., Sant'Anna, F. M., Luiz, L. M. P., Sandes, S. H. C., Silva, C. I. F., Silva, A. M., Nunes, A. C., Penna, C. F. A. M., and Souza, M. R. (2016). "Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons", *Journal of Dairy Science*, Vol. 99 No.8, pp.6086-6096. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10579>

Delgado, J.; Arévalo, A.B.; Nuñez, F. and Asensio, M. (2016), "Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats", *Current Opinion in Food Science*, Vol. 11, pp.40-45. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.003>

Dooley, L.; Lee, Y.S. and Meullenet, J.F. (2010), "The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping", *Food Quality and Preference*, Vol. 21, pp.394-401. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.10.002>

Freitas-Sá, D.G.C.; Mattos, C.T.G.B. and Monteiro, R.P. (2016), "Descrição sensorial do queijo do Serro: uma contribuição para definição do período de maturação dos queijos artesanais", *Anais, XXV Brazilian Congress of Food Science and Technology, SBCTA, Gramado*.

INPI. (2011), "IG201001: Indicação Geográfica–Serro", *Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)*, Brasília, DF.

IPHAN (National Institute of Historical and Cultural Heritage) (2008), "Immaterial heritage", *Registered goods*, 13. Artisan way to make Minas cheese in Serro, Canastra and Salitre regions.

Issanchou, S. (2008), "L'analyse sensorielle du fromage (aspect scientifique)", G., Corrieu and F.M., Luquet (Ed.) *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*, Lavoisier, Paris, FR.

Jaeger, S. R., Beresford, M. K., Paisley, A. G., Antúnez, L., Vidal, L., Cadena, R. S., Giménez, A. and Ares, G. (2015), "Check-all-that-apply (CATA) questions for sensory product characterization by consumers: Investigations into the number of terms used in CATA questions", *Food Quality and Preference*, Vol. 42, pp. 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.02.003>

Licitra, G., Caccamo, M. and Lortal, S. (2019), "Artisanal products made with raw milk", Nero, L.A. and Carvalho, A.F. (Ed.). *Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits*. Academic Press, London, UK, pp.175-221.

Martins, J.M., Galinari, É., Pimentel-Filho, N.J., Ribeiro Jr., J.I., Furtado, M.M. and Ferreira, C.L.L.F. (2015), "Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese", *Brazilian Journal Microbiology*, Vol. 46 No. 1, pp.219-230. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131003>

McSweeney, P.L.H. (2004), "Biochemistry of cheese ripening", *International Journal Dairy Technology*, Vol. 57, pp.127-144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>

Monteiro, R.P. (2018), "O Queijo Minas Artesanal e seu Potencial para a Agroindústria Familiar", Monteiro, R.P.; Matta, V.M. (Ed.). *Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar*, Embrapa, Brasília, DF, pp.11-14. Available at: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf> (accessed 30 July 2020)

Monteiro, R.P. and Chaves, A.C.S.D. (2018), "Tradição e Contradição: Queijo Minas Artesanal, Patrimônio Histórico, Legislação e Pesquisa", Monteiro, R.P.; Matta, V.M. (Ed.). *Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar*, Embrapa, Brasília, DF, pp.15-34. Available at: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf> (accessed 30 July 2020)

Monteiro, R.P., Chaves, A.C.S.D., Freitas de Sá, D.G.C., Matta, V.M. and Takeiti, C.Y. (2018), "Projeto Agregarte", Monteiro, R.P.; Matta, V.M. (Ed.). *Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar*, Embrapa, Brasília, DF, pp.35-54. Available at: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf> (accessed 30 July 2020)

Ng, M., Chaya, C. and Hort, J. (2013), "The influence of sensory and packaging cues on both liking and emotional, abstract and functional conceptualizations" *Food Quality and Preference*, Vol. 29, pp.146-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.03.006>

Nóbrega, J.E. (2012). "Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais". 115p. *Thesis* (Doctorate in Food Science and Technology) – Universidade Federal de Viçosa.

Pereira, D.A. (2019), "Efeito de diferentes condições de maturação nas características do queijo minas artesanal", 100p. *Thesis* (Doctorate in Food Science) – Universidade Federal de Lavras.

Peryam, D R., and Pilgrim, F.J. (1957). Hedonic scale method of measuring food preferences, *Food Technology*, Vol.11, Suppl., pp.9-14.

Plaehn, D. (2012), "CATA penalty/reward", *Food Quality and Preference*, Vol. 24, pp.141-152.

Resende, E.C. (2014), "Aspectos sensoriais e microbiológicos do queijo Minas Artesanal da microrregião do Campo das Vertentes", 114p. *Dissertation* (Professional Master in Science and Technology of Milk and Derivatives) – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Varela, P. and Ares, G. (2012), Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. *Food Research International*, Vol. 48 No 2, pp.893-908. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.037>

Williams, E.J. (1949), "Experimental designs balanced for the estimation of residual effects of treatments", *Australian Journal of Scientific Research*, Vol. 2 No 3, pp.149-168.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apontados, nesta pesquisa, demonstraram a importância da realização de estudos utilizando os queijos artesanais maturados na propriedade de origem.

Ficou evidente que as diferenças foram maiores entre os produtores do que em relação ao tempo de maturação, as diferentes condições de maturação mostraram ter uma maior influência sobre as características dos queijos.

A ausência da etapa de lavagem dos queijos modificou tanto as características sensoriais, quanto as bioquímicas. A presença de fungos na casca do queijo gerou alterações nas características sensoriais, que levaram à maior apreciação das características de sabor/aroma/textura, apesar da aparência não ter sido aceita. O crescimento de fungos na superfície dos queijos também influenciou à proteólise, intensificando-a.

Verificou-se que houve influência da estação do ano nas características dos queijos, os queijos do verão apresentaram proteólise mais intensa quando comparada à do inverno. Os queijos com maior tempo de maturação foram os mais aceitos no verão, enquanto, no inverno, os queijos menos maturados tiveram maior aceitação.

Os resultados desta tese abrem caminho para o entendimento das transformações que ocorrem durante a maturação do QMA do Serro e possibilitam a preservação e padronização deste importante produto artesanal e histórico.

Anexo

Método de Eletroforese de Proteínas TRIS/TRICINA Modificado para Identificação da Hidrólise das Caseínas ao Longo da Maturação de Queijos

Tatiana de Lima Azevedo⁽¹⁾

Juliana de Oliveira Carneiro⁽²⁾

Marilia Penteado Stephan⁽³⁾

Alexsandro Araújo dos Santos⁽⁴⁾

Ana Carolina Sampaio Doria Chaves⁽⁵⁾

¹Licenciada em Química, especialista em Ciências Ambientais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

²Engenheira de Alimentos, doutoranda da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

³Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴Técnico em Alimentos, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁵Engenheira de Alimentos, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Comunicado Técnico Embrapa nº 238 – Setembro/2019.

INTRODUÇÃO

Durante a maturação de queijo ocorrem simultaneamente várias reações físicas, químicas e bioquímicas. Inicialmente ocorre a hidrólise do açúcar e pode ocorrer também a hidrólise de gordura (lipólise) e das proteínas (proteólise). A proteólise afeta o sabor e a textura dos queijos ao longo da maturação. A duração da maturação pode variar de alguns dias até mais de dois anos, dependendo do tipo de queijo e de quanto valor quer se agregar ao produto final. As condições de maturação têm influência direta na qualidade e nas características sensoriais do queijo, tais como: textura, sabor e aroma.

O objetivo deste trabalho foi apresentar a técnica de eletroforese TRIS/TRICINA modificada pela inclusão da etapa de retirada da gordura das amostras de queijo que era um grande interferente nesta análise. A modificação da técnica tornou possível a obtenção de géis com bandas bem definidas, claras e, conseqüentemente, de fácil interpretação.

Preparo das amostras

Para ilustrar a técnica modificada, foram analisadas amostras de Queijo Minas Artesanal do Serro com 17 e 60 dias de maturação, produzidos e maturados em uma propriedade rural (na sala de maturação) no município do Serro, Minas Gerais conforme preconiza a legislação vigente. A Figura 1 apresenta os queijos Minas Artesanal do Serro analisados com 17 dias e 60 dias de maturação.



Figura 1: Queijos Minas Artesanal do Serro com 17 e 60 dias de maturação

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA TRIS/TRICINA

As amostras foram trituradas e congeladas para liofilização por 24 horas em liofilizador (Marca LioTop, modelo L101 ou similar). Extrai-se a proteína pesando-se 2 mg de queijo em um tubo e dissolvendo em 1 mL de solução tampão (pH 6,8 contendo 4% SDS, 12% glicerol, 2% mercaptoetanol e 0,01% Coomassie blue G250) e tubo deve ser mantido sob agitação por uma hora em temperatura ambiente.

A retirada de gordura dos queijos foi realizada da seguinte forma: amostra dissolvida em solução tampão foi mantida sob refrigeração (4 °C) por 24 horas, centrifugada em temperatura ambiente por um minuto a 5433 g. Com o auxílio de um pipetador automático, foi realizada a retirada da amostra (a proteína desengordurada) da fase intermediária, entre o precipitado sólido (depositado no fundo do tubo) e o sobrenadante com a gordura do queijo na parte superior do tubo.

Utilizando a técnica TRIS/TRICINA sem a modificação (ou seja, sem a retirada de gordura) não foi possível observar bandas de proteínas claras no gel de eletroforese. A corrida ficou distorcida em função da elevada quantidade de gordura presente, dificultando a interpretação dos resultados.

Na eletroforese foi utilizado um sistema da marca Bio-Rad (ou equivalente) e a preparação dos géis foi realizada de acordo com o proposto por SCHÄGGER e JAGOW (1987). No método eletroforético foram utilizados três géis com as seguintes concentrações de acrilamida: (1º) com 16,5% para o gel de separação, (2º) com 10% para espaçamento e (3º) com 4% para aplicação da amostra. Foi aplicado 30 µL de cada amostra e a corrida do gel ocorreu sob uma tensão de 15 V por 15 horas e com 85 mA por 6 h segundo STEPHAN et al (2013). No gel foi aplicado também um padrão da marca Bio-Rad com as seguintes proteínas (em kDa): triose-fosfato isomerase (26,625), mioglobina (16,950), α -lactalbumina (14,437), aprotinina (6,512), insulina β -oxidada (3,496) e bacitracina (1,423).

Ao final da corrida, o gel foi colocado sob agitação em solução fixadora com 50% metanol e 10% ácido acético por uma hora. Subsequentemente, o gel foi lavado com água destilada e submerso em uma solução corante com 0,025% de azul de Coomassie G250 e 10% de ácido acético por duas horas. Para descolorir

o gel utilizou-se uma solução descolorante (com 10% de ácido acético), o mesmo foi mantido imerso sob agitação nesta solução por duas horas, a solução foi trocada a cada trinta minutos, com quatro repetições. O gel foi então lavado com água destilada e digitalizado no Scanner (marca GE, modelo Image Scanner III ou similar). Na Figura 2 pode ser observado o fluxograma com as principais etapas da técnica de eletroforese TRIS/TRICINA modificada.

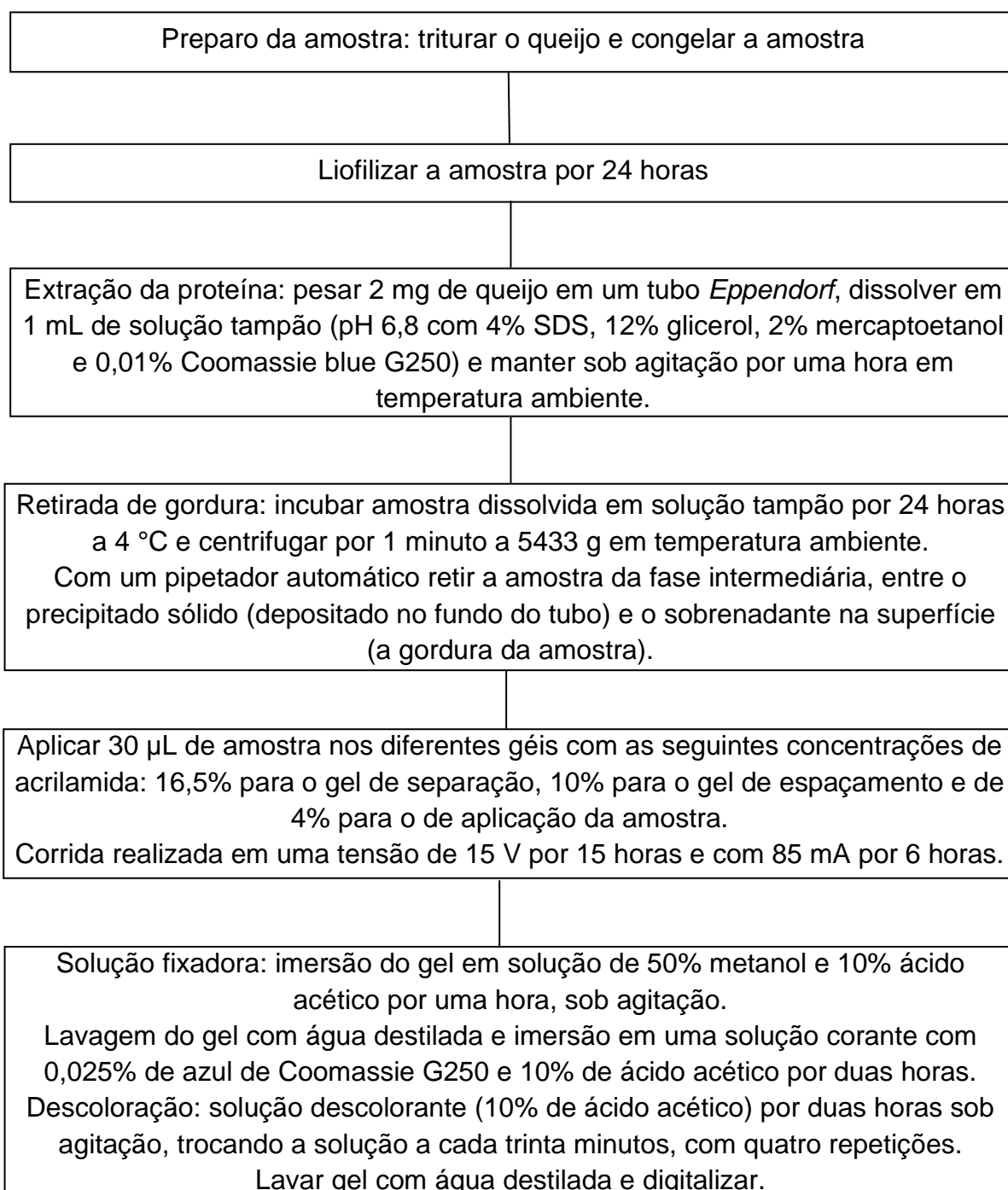


Figura 2: Fluxograma da técnica de eletroforese TRIS-TRICINA modificada

Avaliação da hidrólise das caseínas dos queijos

Na Figura 3 pode ser observado o gel com as amostras dos queijos sem a modificação, ou seja, sem a etapa de retirada da gordura. Neste gel foi possível se observar as distorções e a falta de nitidez das bandas em função do elevado conteúdo de gordura das amostras (variando de 20 a 30% de gordura), em especial na faixa entre 26,6 e 6,5 kDa. Na região de 6,5 até 1,4 kDa as bandas encontram-se totalmente indefinidas, o que indicou a necessidade de ajuste do método.

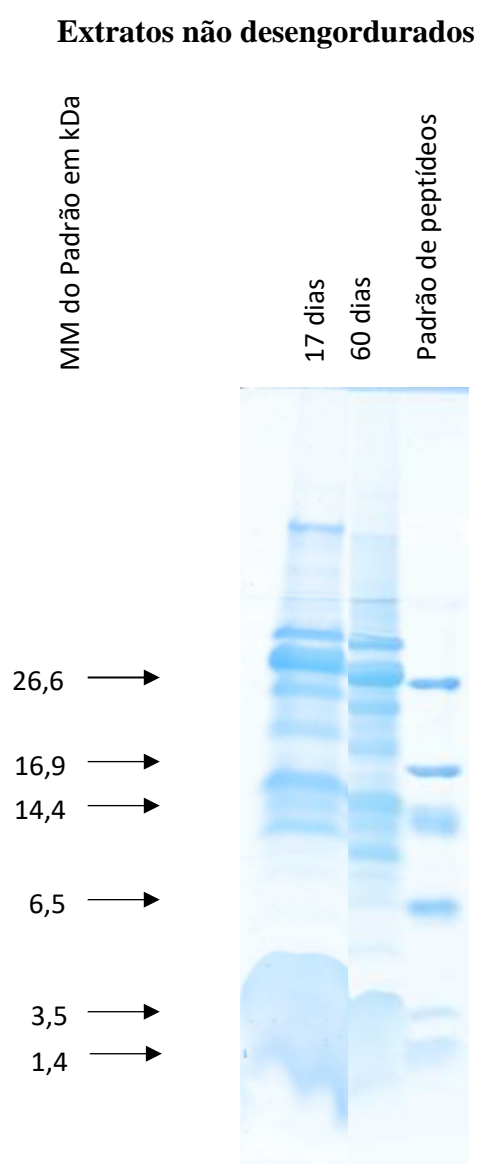


Figura 3. Perfil eletroforético do gel com as amostras de queijos com 17 e 60 dias de maturação sem a etapa de retirada da gordura.

Foi realizada a modificação no preparo das amostras, incluindo-se a etapa de desengorduramento. A eficácia da modificação da técnica pode ser facilmente visualizada na Figura 4, onde observa-se claramente a melhora no perfil proteico das amostras dos queijos com os diferentes tempos de maturação (17 e 60 dias). Com esta modificação foi possível observar bandas bem definidas, claras e um gel sem distorções (Figura 4). Foi possível observar uma grande diferença entre géis com e sem a etapa de retirada da gordura.

Extratos desengordurados

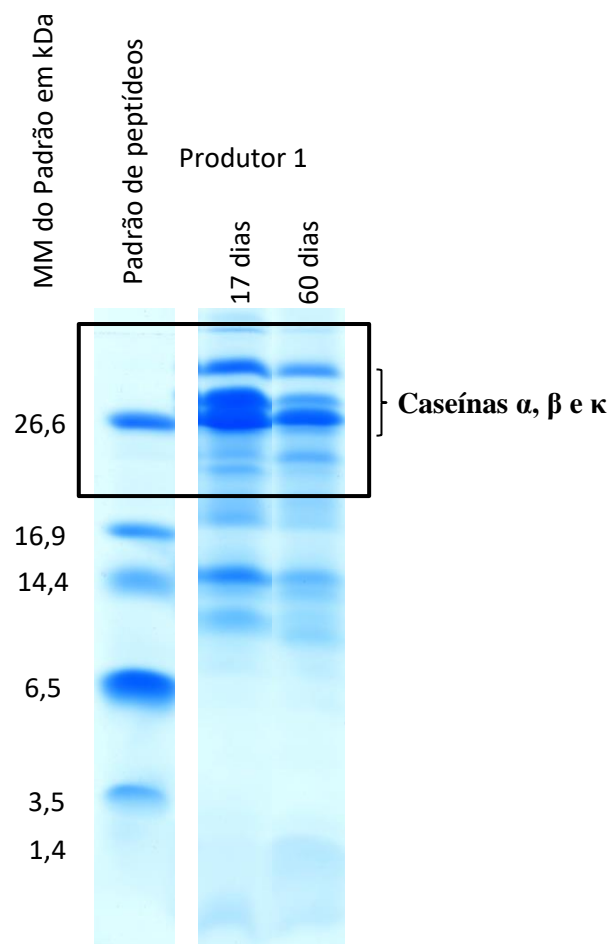


Figura 4: Perfil eletroforético do gel das amostras de queijo desengorduradas com 17 e 60 dias de maturação.

Na Figura 4 observa-se o perfil proteico dos queijos com 17 e 60 dias de maturação. Com 17 dias de maturação as frações de caseína α , β e κ encontravam preservadas, enquanto que com 60 dias de maturação observou-se uma diminuição na intensidade destas bandas, indicando que houve proteólise das caseínas ao longo da maturação, porém, ela não foi muito acentuada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de eletroforese TRIS/TRICINA modificada foi eficiente na identificação das diferentes frações de proteína (com bandas claras e sem distorções), por esta técnica é possível observar a formação de peptídeos de diferentes tamanhos ao longo da maturação.

A etapa de retirada da gordura possibilitou a clara visualização das bandas de caseínas e/ou peptídeos. Essa técnica pode ser utilizada como uma ferramenta para monitorar o nível de proteólise dos queijos ao longo da maturação.

Referências Bibliográficas

PERRY, K.S.P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos.** Química Nova. 2004, v. 27, n. 2, p. 293-300.

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G.V. **Tricine-Sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the ranger from 1 to 100 kDa.** Analytical Biochemistry. 1987, v. 166, p. 368-379.

STEPHAN, M.P.; AZEVEDO, T.L.; SILVA, C.M.; SANTOS, A.A.; FURTADO, A.A.L.; PONTES, S.M. **Implantação do Método de Eletroforese Tris-tricina para Identificação de Peptídeos em Croquete de Carne Mecanicamente Separada de Tilápia.** Rio de Janeiro, Embrapa Agroindústria de alimentos, 2013. Comunicado técnico, N°197.